

Karakterisering av et pIgR-liknende gen i berggylt (*Labrus bergylta*)

Elina Liepa



Masteroppgave ved Institutt for biovitenskap

UNIVERSITETET I BERGEN

Mai 2021

Forord

Denne masteroppgaven ble utført som en del av profesjonsstudiet i fiskehelse ved Universitetet i Bergen, ved fiskesykdomsgruppen sine laboratorier tilhørende Institutt for biovitenskap. Oppgaven omhandler immunologiske studier av rensefisken berggylt, og hovedmålet med denne oppgaven var å karakterisere et pIgRL-gen, som et ledd i å få bedre oversikt over sentrale molekyler i immunsystemet hos denne arten. Oppgaven er skrevet på norsk, men på grunn av manglende gode norske oversettelser har det blitt brukt en del engelske begreper.

Denne oppgaven har vært lang og lærerik prosess som har blitt skrevet samtidig som verden ble rammet av en av de største pandemier.

Stor takk til veileder Ivar Hordvik for uendelig tålmodighet og gode forklaringer. Stor takk til Lindsey Moore for opplæring på laboratoriet og veiledning i alle spørsmål knyttet til Excel og utregninger av mengder. Jeg vil også takke PhD-student Angela Etayo for gode råd og anbefalinger av bioinformatiske verktøy.

Til slutt takker jeg min samboer Sjur Øyen, venninne Ingrid Kjelsvik og mamma Elizabete Mengele for gode ord og støtte.

Sammendrag

«Polymeric Immunoglobulin Receptor» (pIgR) er et molekyl som er involvert i transport av antistoffer gjennom epitelet og ut i mukus. Et molekyl som antas å ha en tilsvarende rolle hos fisk er publisert fra flere teleoster. Da dette studiet ble påbegynt var pIgR i berggylt delvis karakterisert, men uttrykkmønsteret var ikke helt som forventet dersom dette genet skulle være en funksjonell homolog til pIgR i høyerestående dyr. Ved søk mot berggyltgenomet ble det oppdaget et pIgR-liknende (L) gen som scoret høyt med hensyn på sekvenslikhet. Dette genet ble valgt ut for nærmere studier, og ble tema for denne masteroppgaven. Det viste seg at berggylt pIgRL-genet genererer minst tre forskjellige spleisvarianter. En av disse viste seg å kode for et polypeptid med en lengre hengselregion som sannsynligvis er O-glykosylert. Berggylt pIgRL koder for 3 immunoglobulin-liknende domener (ILD), i motsetning til pIgR- og andre publiserte pIgRL-gener fra teleoster som koder for to ILD. Ved søk i databasen GenBank ble det identifisert upubliserte pIgRL-gener fra flere arter av teleoster med relativt høy likhet til berggylt. Disse molekylene hadde 3 eller flere ILD. Årsaken til at pIgRL-genet hos berggylt scoret høyt mot pIgR i høyerestående dyr skyldtes sannsynligvis at molekylet er mer likt i overordnet struktur på grunn av 3 ILD. Mengden pIgRL-transkripter varierte i stor grad mellom de forskjellige organene. Gjelle viste seg å ha det høyeste nivået av pIgRL-transkripter. Nivået i milt og nyre var også høyt i forhold til de andre undersøkte vevene; muskel, lever, hud og tarm. Ekspresjonsmønsteret tyder på at pIgRL-molekylet er en reseptor på en populasjon av leukocytter hos berggylt, og ikke en funksjonell homolog til pIgR i høyerestående dyr.

Forkortelser

APC: Antigen Presenterende Celle

BcR: B-celleReseptor

BLAST: «Basic Local Alignment Search Tool»

bp: Basepar

CD4: Co-reseptor uttrykt på overflaten av T-hjelpeceller

CD8: Co-reseptor uttrykt på overflaten av cytotoksiske T-celler

cDNA: Komplementær DNA («complementary DNA»)

CD3ε: Sub-enheten av TCR co-reseptoren CD3

CTL: Cytotoksiske T-celler

Cy: Cytoplasmatisk hale

dsDNA: Dobbeltrådig DNA

GALT: «Gut Associated Lymphoid Tissue», lymfoide vev i tarm

HIB: Høyteknologisenteret i Bergen

Ig: Immunglobulin

ILD: Immunglobulin-Liknende Domene

IL: InterLeukin

ILT: «Interbranchial Lymphoid Tissue», lymfoid vev i gjeller

IFN- Interferon

Kb: Kilos base

kDa: Kilo Dalton

LB: Lysogen Buljong

MALT: «Mucosa-Associated Lymphoid Tissue», mucus- assosiert lymfoid vev

MHC: Vevsforlikelighetsgenkomplekset som koder for MHC molekyler

(«MajorHistocompatibility Complex»)

mIgM: Membranbundet IgM

mIgT: Membranbundet IgT

MPA: Beskyttet marint område («Marine Protected Area»)

mRNA: Budbringer RNA («messengerRNA»)

NALT: «Nasopharynx- Associated Lymphoid Tissue», lymfoide vev i nesehull

nm: Nanometer

NTC: «No Template Control»/ negativ kontroll

PAMPs: «Pathogen Associated Molecular Patterns », konserverte strukturer hos mikrober

PCR: polymerase kjedereaksjon («Polymerase Chain Reaction»)

pIgR: «polymeric Immunoglobulin Receptor»

pIgRL: «polymeric Immunoglobulin Receptor-Like»

PRR: «Pathogen Recognition Receptor»

qPCR: Kvantitativ PCR («quantitative PCR»)

RCF: Relativ sentrifugalkraft («Relative Centrifugal Force»)

RNA: Ribonukleinsyre («RiboNucleic Acid»)

RT-PCR: Revers Transkripsjon - PCR («Reverse Transcription - PCR»)

ROS: Reaktive oksigenforbindelser

SALT: «Skin Associated Lymphoid Tissue», l lymfoide vev i hud

SHM: Somatisk Hyper-Mutasjon

sIgM: Utskilt IgM

sIgT: Utskilt IgT

SP: Signal peptid

TAE: Buffer som inneholder tris base, eddiksyre og EDTA

TCR: T-Celle Reseptor

T_h: T-hjelpe celle

TLR: Toll-Liknende Reseptor

TM: Transmembran

μl: Mikroliter

Innholdsfortegnelse

Innledning (1)	1
Lakselus i norsk oppdrettsnæring (1.1)	1
Rensefisk i norsk oppdrettsnæring (1.2)	2
Berggylt (1.3)	3
Immunsystemet hos teleoster (1.4)	4
Lymfoide organer hos teleoster (1.4.1)	5
Mukosal immunitet (1.4.2)	5
Det medfødte immunsystemet (1.4.3)	6
Det adaptive immunsystemet (1.4.4)	7
Humorale og cellulære komponenter (1.4.4.1)	8
Cellemedierte immunresponser (1.4.4.2)	8
MHC klasse I og MHC klasse II molekyler (1.4.4.3)	10
Humoral immunrespons (1.4.4.4)	11
Immunglobuliner (1.4.4.5)	12
pIgR- og pIgRL- molekyler (1.4.4.6)	16
Immunologiske studier hos berggylt (1.4.5)	18
Målet med oppgaven (2)	20
Metode og materiale (3)	21
Prøvetaking (3.1)	21
RNA-rensing (3.2)	24
Analyse av RNA mengde og kvalitet (3.3)	24
cDNA-syntese (3.4)	25
Polymerase kjedereaksjon (PCR) (3.5)	26
Agarose gelelektroforese (3.6)	27
TOPO-kloning (3.7)	27
Plasmidrensing (3.8)	29
DNA-sekvensering (3.9)	29
Kvantitativ (q) PCR (3.10)	30
Bioinformatiske verktøy (3.11)	31

Resultater (4).....	33
Identifikasjon av berggylt pIgRL (4.1).....	33
Kloning og karakterisering av berggylt pIgRL cDNA (4.2).....	33
Analyse av translatert pIgRL mRNA (4.3).....	46
Estimering av relativ mengde pIgRL mRNA i forskjellige vev i berggylt (4.4).....	52
Diskusjon (5).....	54
Referanser (6).....	60
Appendiks.....	68

Innledning (1)

1.1 Lakselus i norsk oppdrettsnæring

Lakselus (*Lepeophtherius salmonis*) og skottelus (*Caligus elongatus*) er to ektoparasitter som bidrar til store økonomiske tap i merdbasert akvakultur i Nord-Europa (Mordue & Birkert, 2009). Lakselus (*L. salmonis*) er den mest betydningsfulle av de to, på grunn av dens forekomst på atlantisk laks (*Salmo salar*), som det drives utstrakt oppdrett på (Abolofia et al., 2017). Lakselusen er en parasittisk kopepod som beiter på vertens slim, vev og blod (Johnson et al., 2004). Lakselusen har 8 livsstadier, som skilles av skallskifter (Hamre et al., 2013). Lakselus skader fisken og konsekvensene av lusens beiting kan variere fra milde hudskader til stressindusert dødelighet hos individuelle fisk (Costello, 2006). Lusebeiting kan også gi inntrengingsvei til sekundære infeksjoner, der mikrobielle patogener kan trenge inn i fisken og luseskader kan redusere fiskens markedsverdi (Costello, 1993).

For å minske utbredelse av lus og for å redusere skadevirkninger på laksefisk både i oppdrettsanlegg og frittlevende populasjoner i Norge har det blitt utarbeidet overvåkningsprogram (Luseforskriften; Fiskeridepartementet, 2013) for lakselus i oppdrettsanlegg (Torrissen et al., 2013). Overvåkningsprogrammet krever at hvert oppdrettsanlegg har en felles plan for forebygging og behandling av lus i anlegget. Planen skal inneholde telling av lus i anlegget, metoder og rutiner for avlusning, rutiner for bruk av rensefisk og rutiner for brakklegging. Luseforvaltningen i oppdrettsanlegg må evalueres og oppdateres hvert eneste år, og rapporteres til Mattilsynet (Torrissen et al., 2013).

For å bekjempe luseutbredelsen og opprettholde kontroll på lusesituasjonen har det blitt utviklet og tatt i bruk både medikamentelle og medikamentfrie behandlinger. Medikamentelle behandlinger, det vil si bruk av legemidler, kan administreres på to måter: via bad eller via fiskefôret. Legemidler som administreres via bad er Azametiphos, Deltametrin, Cypermethrin som fører til paralyse og dreper lakselusen (Overton et al., 2018). Hydrogenperoksid (H_2O_2) kan også administreres via bad, men den dreper ikke lusen, slik som andre bad-midler, men den forårsaker paralyse, slik at lusen slipper grepet og faller av fisken (Overton et al., 2018). Legemidler som administreres via fôret er Emamectinbenzoat, Teflubenzuron og Diflubenzuron som hemmer kitinsyntesen og er dermed godt egnet til lakselusbehandling, siden lusen er avhengig av skallskifte gjennom livssyklusen (Samuelsen, 2016). Siden kitinsyntesen er essensiell mellom vekststadier blir lakselus som oftest drept gjennom å forstyrre skallskiftet (Branson et al., 2000). Medikamenter som brukes til lusebehandling mangler spesifisitet og kan derfor påvirke «non-target» arter, spesielt krepsdyr

(Burridge et al., 2010). Derfor er det viktig å begrense bruken av kjemoterapeutiske midler og heller bruke alternative behandlingsmetoder. Bruk av legemidler har vært omdiskutert og oppdrettsnæringen har gjort tiltak for å redusere forbruket, som minket fra 2016 til 2018, men økte igjen i 2019 med 16% (Fiskehelserapporten, 2019).

Hyppig bruk av medikamentelle behandlinger mot lakselus har gjort at lakselus har utviklet resistens mot de mest brukte legemidlene (Aaen et al., 2015). Som en konsekvens har medikamentfrie behandlinger, som alternativ til bruk av legemidler, økt kraftig i omfang de siste årene. Først og fremst i form av to behandlingstyper, mekanisk og termisk avlusning. I en termisk avlusning gjennomgår fisken en bad-behandling i oppvarmet vann. I en mekanisk avlusning spyles og/eller børstes fisken. Fisken kan også behandles med ferskvann (Helgesen & Qviller, 2019; Fiskehelserapporten). Det har også blitt utviklet både mekaniske («hydrolicer») og termiske («thermolicer») avlusningssystemer som alternativer til medikamentell behandling og de har blitt tatt i bruk siden 2015, men effekten på behandling er lite omtalt i vitenskapelig litteratur (Overton et al., 2018).

1.2 Rensefisk i norsk oppdrettsnæring

Siden 2010 har rensefisk blitt den mest brukte biologiske bekjempelsen av lakselus i oppdrett av atlantisk laks (Brooker et al., 2018). Rensefisk blir brukt både som behandlingsmetode og forebyggende tiltak. Rensefisk har evne til å leve i symbiose med andre arter og fjerne ektoparasitter fra fiskens hud (Erkinharju et al., 2020). De første forsøkene som introduserte rensefisk i oppdrettsnæringen ble gjort på 80-tallet og viste seg å gi gode resultater (Bjordal, 1988). Dette la grunnlaget for videre økning i kommersiell skala (Bjordal et al., 1991). Rensefisk som blir brukt i norsk oppdrett er rognkjeks, grønngylt, bergnebb, rødnebb, gressgylt og berggylt. Etterspørsel av rensefisk er stadig økende og rensefisk har blitt den nest største artsgruppen etter laksefisk i norsk akvakultur (Fiskeridirektoratet, 2020). Og som for tradisjonelt oppdrett av laks har også rensefisk produksjon sine utfordringer i forhold til helse og velferd (Brooker et al., 2018).

I Norge oppdrettes det to arter av rensefisk: rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) og berggylt (*Labrus bergylta*). Av oppdrettede rensefisk er rundt 90% rognkjeks og resterende er leppefisk (Rimstad et al., 2017). Det er vanlig å ha rundt 5% berggylt eller 10 - 15% rognkjeks i oppdrettsmerdene sammen med laks (Brooker et al., 2018).

Selv om både berggylt og rognkjeks kan brukes som rensefisk er disse to artene ganske forskjellige, både når det gjelder anatomi, fysiologi og habitat-preferanser (Brooker et al.,

2018). Berggylt trives best i varmere temperaturer og er best egnet i lusebekjempelse om sommeren, mens rognkjeks kan «plukke» lus også ved lavere temperaturer (Imsland et al., 2018; Rimstad et al., 2017). Siden disse to artene trives best ved forskjellige temperaturer kan det være effektivt å ha både berggylt og rognkjeks i laksemerdene (Brooker et al., 2018). Selv om det drives oppdrett på berggylt, er denne næringen i utviklingsstadiet og mesteparten av leppefiskene kommer fortsatt fra villfangst (Fiskehelsesrapport, 2019). Behovet for leppefisk er stadig økende, og det transporteres leppefisk fra sør og sørøst i Norge og fra Sverige til nordlige deler av Norge (Skiftesvik et al., 2014). Effekten av fiskeriet på ville bestander av leppefisker i Norge er ukjent på grunn av manglete data (Halvorsen et al., 2016), men det antas å minke diversiteten og ha negativ påvirkning på lokale bestander. For å redusere negative effekter av fiskeriet og for å bevare ville bestander av leppefisk har det blitt innført kvoteråd og reguleringer av fiskeutstyr og minstemål på fisk som kan beholdes, samtidig som fiskeforbud fra januar til juli må følges (Halvorsen et al., 2016). Det er også introdusert beskyttede områder der fising av leppefisker ikke tillates (MPA: «marine protected area») med formål å beskytte naturlige habitater og biodiversiteten til leppefiskene (Halvorsen et al., 2016). Det er flere utfordringer assosiert med helse og velferdssituasjonen til rensefiskene. Bakterielle infeksjoner, virus, parasitter og sopp er blant de faktorer som forårsaker tap av rensefisk både i produksjonssyklusen og ute i oppdrettsanleggene (Rimstad et al., 2017). Siden berggylt er den eneste arten av leppefisk som blir oppdrettet i Norge og viser seg å være effektiv i kampen mot lus (Skiftesvik et al., 2014; Skiftesvik et al., 2016) er det gunstig å vite mer om immunsystemet og utvikle redskaper for å måle immunresponser hos denne fiskearten.

1.3 Berggylt

Berggylt (*Labrus bergylta*) tilhører familien: Osteichthyes: Perciformes: Labridae, som er den tredje mest tallrike familien av teleoster, med rundt 600 kjente arter (Parenti & Randall, 2011). Berggylt er en av de seks leppefisk-artene som finnes i norsk farvann og kjennetegnes ved å ha markerte lepper og tenner. Habitatet til berggylt er utelukkende langs kysten og den foretrekker områder med tang og tare som brukes til skjul. Arten er utbredt i den østlige delen av Atlanterhavet og området strekker fra Marokko i sør til Trondheimsfjorden i nord (Treasurer, 2018). Føde til berggylt består av bunnlevende dyr, som muslinger, små krepsdyr og alger. I tillegg har berggylt evne til å plukke ektoparasitter fra hud til andre fisker, og

basert på denne egenskapen har berggylt blitt tatt i bruk i akvakultur for bekjempelse mot lakselus (Figueiredo et al., 2005; Hordvik & Mortensen, 2019). Morfologisk kan berggylt deles i to grupper basert på fargemønsteret: ensfarget, vanligvis rødlig, brun eller grønn med mørkere farge på dorsal side og lysere på ventral side, den andre gruppen har rødlig/mørkeoransje grunnfarge med lysere prikker (Villegas-Rios et al., 2013). Berggyt er hermafrodit: Livssyklusen til berggyt begynner som hunner, der fisken skifter kjønn til hanner når fisken har nådd 40 cm lengde og er rundt seks år (Muncaster et al., 2013). I ville bestander er kun rundt 10% hanner og som oftest dominerer en hannfisk et territorium med flere hunner (Leclerc et al., 2014).

Et særtrekk i berggyt er fravær av magesekk, og de har en relativt kort tarm i forhold til kroppen (Lie et al., 2018). Det finnes store mengder antistoff-produserende celler i tarmvev, noe som har vært foreslått å ha sammenheng med fraværet av magesekk (Bilal et al., 2019; Hordvik & Mortensen 2019).

1.4 Immunsystemet hos teleoster

I likhet med immunsystemet hos høyerestående dyr kan immunsystemet hos teleoster deles inn i to deler, det medfødte («innate») og det adaptive immunsystemet («acquired»). Det medfødte immunsystemet gir hurtig, uspesifikk immunrespons mot patogene mikrober. Denne immunresponsen rettes mot strukturer som er typisk for grupper av patogener, men gir ikke langvarig beskyttelse (Ellis, 2001; Uribe et al., 2011; Murphy & Weaver, 2017). Teleoster er frittlevende organismer som fra et tidlig livsstadium lever i akvatiske miljø med høy konsentrasjon av mikroorganismer til stede (Salinas, 2015), og det medfødte immunsystemet har dermed en hovedrolle i beskyttelsen mot sykdomsfremkallende agens i tidlige livsstadier (Uribe et al., 2011). Det adaptive immunsystemet tar lengre tid til å bli aktivert. Det har imidlertid evne til å utvikle «immunologisk hukommelse», og når verten kommer i kontakt med samme patogen senere vil den ha evne til å fremkalle en rask spesifikk respons (Uribe et al., 2011). Som regel blir det adaptive immunsystemet satt i gang som følge av den medfødte immunresponsen og bestemmer på hvilken måte det adaptive immunsystemet responderer i sykdomsforløpet (Magnadóttir et al., 2005). Medfødte og adaptive immunresponser kan omtales som sammensatte mekanismer (Magnadóttir et al., 2005). I evolusjonært perspektiv er fisk den første dyrearten som uttrykker molekylene i det klassiske adaptive immunsystemet: T-cellerreseptorer, «major histocompatibility complex» (MHC), antigener og immunglobuliner (antistoffer) (Koppang et al., 2010).

1.4.1 Lymfoide organer hos teleoster

I fravær av beinmarg og lymfesystem, som er essensielle hos pattedyr, er de viktigste immunorganene hos teleoster tymus, nyre og milt. Disse kan også betegnes som lymfoide organer, og i tillegg til disse finnes det lymfoide vev i gjellene (Kryvi & Poppe, 2016; Zapata et al., 2006).

Ontogenetiske studier viser at i marin fisk er det nyre som utvikles først, så følger milt og til slutt utvikles tymus (Zapata et al., 2006). Hos teleoster er de primære lymfoide organene tymus og nyre, der nyre også fungerer som et sekundært lymfoid organ sammen med milt (Koppang et al., 2010). Fornyre (hodenyre) kan sammenlignes med beinmarg i høyerestående dyr og har endokrin og hematopoetisk funksjon (Geven et al., 2017; Sunyer, 2013; Uribe et al., 2011).

Studier i regnbueørret viser at modning av B-celler skjer i fornyren, før de videre blir lagret i bakre del av nyren og eventuelt aktivert og videre differensiert til plasmaceller ved hjelp av antigen-presenterende celler (Zwallo et al., 2005). T-celler modnes i tymus, som er det andre immunorganet med primær-lymfoid funksjon. I tillegg til naive T-celler, er makrofager og granulocytter til stede i tymus (Bowden et al., 2005; Uribe et al., 2011). I motsetning til høyerestående vertebrater mangler teleoster lymfeknuter, derfor anses milt som et betydelig sekundært lymfoid organ (Zwallo et al., 2005). B-celler som befinner seg i milten kan aktiveres av antigener og omdannes til plasmaceller, og i milten finnes det også T-celler, som etter modning i tymus migrerer til sekundære lymfoide organer (Zwallo et al., 2005).

Makrofagene som befinner seg i milten deltar i nøytralisering av antigener ved fagocytose (Uribe et al., 2011). I likhet med fornyre inneholder milt melanomakrofag-sentre og det kan sies at det lymfoide vev i hodenyren ligner på miltvev (Kryvi & Poppe, 2016; Uribe et al., 2011). Studier av laks viser betydelige mengder av T-celler samlet i gjellenes epitelvev, betegnet som «interbranchial lymphoid tissue» (ILT) (Kryvi & Poppe, 2016; Koppang et al., 2010). T-celler som befinner seg i ILT blir aktivert av antigener som kommer fra det ytre miljø, og det antas at T-cellene i gjellene har evne til å mobilisere B-celler til infeksjonsstedet (Hordvik, 2015).

1.4.2 Mukosal immunitet

Hos fisk utgjør hud og mukus en viktig del av førstelinjeforsvaret, da dette inneholder både humorale og cellulære komponenter (Uribe et al., 2011). «Mucus associated lymphoid tissue» (MALT) utgjør store deler av det totale overflatearealet hos fisk. Dette er viktig for

gassutveksling og næringsopptak. MALT kan videre deles inn i flere kategorier, basert på hvor i kroppen det lymfoide vevet befinner seg (Salinas et al., 2011).

«Gut associated lymphoid tissue» (GALT) er en betegnelse på forekomst av lymfocytter og lymfoid vev i fordøyelseskanalen. GALT er til stede i alle vertebrater og utgjør en viktig del av den adaptive humorale immunresponsen (Salinas et al., 2011; Salinas & Parra, 2015).

GALT kan deles inn i to deler, et tynt lag med bindevev, «lamina propria» (LP), som inneholder flere typer immunceller, som lymfocytter, plasmaceller, makrofager og granulocytter. Andre komponenter i GALT er øverste epitel-lag (IELT), der det finnes T-celler og B-celler (Kryvi & Poppe, 2016; Salinas et al., 2011). Hos teleoster er alle isotyper av immunoglobulin til stede i GALT. IgT synes å ha en spesiell rolle i mukus og kan oppreguleres kraftig i forbindelse med infeksjoner (Flajnik, 2018).

Hud hos teleoster utgjør en viktig barriere mot sykdomsfremkallende agens og har rikelig med immunceller i epidermis. Dette betegnes som «skin associated lymphoid tissue» (SALT). SALT er unikt for teleoster og amfibier. Cellene i epidermis deler seg stadig gjennom mitose og produserer mukus, som inneholder immunoglobulin (mest IgM), proteoglykaner, glykoproteiner og reaktive enzymer, og fungerer både som beskyttelse og transportmekanisme for immunceller (Kryvi & Poppe, 2016; Salinas et al., 2011). I mukus finnes det flere typer fagocyterende celler, som makrofager, granulocytter sacciforme celler og malpighian celler, og patogener som fanges opp av mukus fjernes ved hjelp av disse celletypene. Tilstedeværelse av dendritiske celler i mukus indikerer at det adaptive immunforsvaret aktiveres via antigenpresentasjon (Munang'andu et al., 2015)

Gjellene hos fisk utgjør hovedorganet for gassutveksling (respirasjon). Gjellene er stadig eksponert for det ytre miljøet, og kan dermed fungere som innfallsport for patogene mikroorganismer. I likhet til andre kroppsoverflater er gjellene beskyttet av mukus som produseres av slimceller (Salinas & Parra, 2015; Xu et al., 2016). Lymfoide vev i gjellene betegnes som «gill associated lymphoid tissue» (GIALT) (Munang'andu et al., 2015; Xu et al., 2016). I GIALT aktiveres T-lymfocytter, både cytotoksiske T-celler og T-hjelpeceller (Munang'andu et al., 2015). Siste komponenten av mukosal immunitet er «nasopharynx-associated lymphoid tissue» (NALT) som fungerer som førstelinje beskyttelse mot patogener. NALT er lite undersøkt, men det antas at T-celler er til stede (Salinas 2015).

1.4.3 Det medfødte immunsystemet

Gjennom sin livssyklus er fisk i nærkontakt med diverse sykdomsfremkallende agens som bakterier og virus. Mekanismer i det medfødte immunsystemet er de første som responderer

mot inntrengende mikroorganismer ved å fjerne eller uskadeliggjøre dem (Ellis, 2001). Det medfødte immunsystemet består av ulike deler: fysiske barrierer, celler og humorale faktorer (Magnadóttir, 2010; Uribe et al., 2011). Hovedparten av cellene involvert i det medfødte immunsystemet er myeloide celler. Makrofager er de blant de første cellene som migrerer til infeksjonsstedet (Mutoloki et al., 2014; Uribe et al., 2011). I teleoster forekommer en unik form av makrofager, kalt melanomakrofager, som ikke finnes hos andre vertebrater. Melanomakrofager inneholder melanin og forekommer typisk ved betennelsesstedet (Mutoloki et al., 2014). Nøytrofile granulocytter er blant de første fagocytter som tiltrekkes hvis betennelse har oppstått. De danner reaktive oksygenforbindelser (ROS) som eliminerer bakterier (Ellis et al., 2011). Granulocytter kan være antigen-presenterende celler i fisk (Rønneseth et al., 2014). Dendritiske celler er en gruppe av myeloide celler som har antigen-presenterende egenskaper og fremkaller spesifikk immunrespons ved å presentere antigenet til T-celler. Dendritiske celler er kjent for å koble sammen det medfødte og det adaptive immunsystemet (Mutoloki et al., 2014). Ikke-spesifikke cytotoksiske celler har lik funksjon som «Natural killer cells» (NK-celler) i høyerestående dyr (Uribe et al., 2011). Disse cellene har evne til å nøytralisere virus uten å gjenkjenne MHC-strukturer på overflaten av virus (Ellis., 2011). For å gjenkjenne patogene mikroorganismer bruker det medfødte immunsystemet «pathogen recognition receptors» (PRR). De identifiserer «pathogen associated molecular patterns» (PAMPs) som er til stede hos prokaryote mikroorganismer. Molekyler som tilhører PAMPs er bakterielle lipopolysakkarider (LPS) og peptidoglykaner, flageliner, enkelt- og dobbeltrådig virus RNA og CpG DNA (Magnadóttir, 2010). PRR i teleoster inkluderer «Toll-like receptors» (TLRs), «Nod-like receptors», «RIG-I-like receptors» og komplementsystemet. TLRs har evne å feste seg til patogener og aktiverer cytokiner som interferoner (IFN) og interleukiner (IL) (Chang et al., 2011). Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet, men også en viktig komponent i det adaptive immunsystemet (Secombes & Wang, 2013).

1.4.4 Det adaptive immunsystemet

Det klassiske adaptive immunsystemet er til stede kun i vertebrater og det antas at det oppstod for mer enn 450 million år siden (Magnadóttir, 2010). Nøkkelelementer i det klassiske adaptive immunsystemet er tymus, B- og T-lymfocytter, og rekombinasjonsaktiverende gener (RAG) (Magnadóttir, 2010). Hos teleoster utgjør lymfocytter hovedkomponentene i det adaptive immunsystemet. De aktiveres av patogenet og utvikles til effektor-celler med spesifikke reseptorer for det gitte antigenet (Flajnik & Kasahara, 2010). I likhet med det

medfødte immunsystemet, omfatter det adaptive immunsystemet cellulære og humorale deler. Den cellulære delen består av B- og T-celler, mens den humorale delen består av immunglobuliner. Det adaptive immunsystemet aktiveres seinere i sykdomsforløpet, men har evne til å gi langvarig beskyttelse og utvikle «immunologisk hukommelse», dvs evne til å gi spesifikk immunrespons på kort tid når de møter et «kjent» patogen (Flajnik & Kasahara, 2010; Mashoof et al., 2016; Murphy & Weaver, 2017).

1.4.4.1 Humorale og cellulære komponenter

Det adaptive immunsystemet identifiserer patogener ved hjelp av immunglobuliner, T-cellerreseptorer (TCR) og MHC klasse I og II molekyler. B- og T-celler tilhører den cellulære delen av det adaptive immunsystemet og gir cellediært immunrespons, mens immunglobulinene er hovedelementene i den humorale delen (Magnadottir et al., 2005). Den cellulære delen responderer, ved intracellulære infeksjoner, ved hjelp av T-celler, mens B-celler aktiveres særlig av ekstracellulære patogener. Det adaptive immunsystemet aktiveres først ved hjelp av makrofager, som etter fagocytose av patogenet blir til antigenpresenterende celler. Fragmenter av antigenet blir presentert på overflaten av makrofagen ved hjelp av MHC-molekyler og T-celler gjenkjenner antigenet som blir presentert (Murphy & Weaver, 2017). T-hjelpeceller har evne til å gjenkjenne patogener som har blitt fagocytet og presentert ved hjelp av MHC II-molekyler. Cellene som inngår i denne celle-medierte immunresponsen betegnes også som CD4⁺ T-celler (Murphy & Weaver, 2017). Disse T-hjelpecellene aktiverer B-celler, som videre utvikles til plasmaceller som produserer antistoff eller «hukommelses-celler» (Diaz-Rosales et al., 2019). Både B-celler og T-celler kan lagres som «hukommelsesceller». Disse cellene sikrer raskt og effektiv immunrespons som aktiveres ved gjentatt eksponering for samme antigen ved et senere tidspunkt (Murphy & Weaver, 2017).

1.4.4.2 Celledierte immunresponser

Celledierte immunresponser omfatter ulike T-cellepopulasjoner. På overflaten av T-celler finnes molekyler kalt for T-cellerreseptorer (TCR). Med utgangspunkt i disse reseptorene kan T-celler deles inn i to hovedtyper. T-cellerreseptorene består av to polypeptid-kjeder kalt alfa og beta (α og β), eller gamma og delta (γ og δ). I tillegg til domener på utsiden av cellen har reseptorene en transmembran-del og en kort cytoplasmisk hale (Castro et al., 2011; Jonson & Lewis, 2002; Moore et al., 2005; Murphy & Weaver, 2017). Kun en type reseptor kan uttrykkes på cellemembranen av T-cellen, dermed kan T-celler deles i $\alpha\beta$ T-celler og $\gamma\delta$ T-celler. Hos fisk som hos pattedyr har det blitt beskrevet både $\alpha\beta$ og $\gamma\delta$ TCR (Castro et al.,

2011). $\alpha\beta$ T-celler er den celletypen som det finnes mest av. Og de er konsentrert i lymfoide vev, mens $\gamma\delta$ T-celler er typisk involvert i mukosal immunitet (Bilal et al., 2018).

I likhet med immunglobuliner består hver av TCR-subenheterne av et variabelt domene og et konstant domene. Det variable domenet av α - og β -kjedene danner til sammen et bindingssete for antigen. For at en T-celle skal aktiveres gjennom signaler som overføres fra celleoverflaten til cellekjernen, trenger TCR hjelp av et overflate-proteinkompleks som er bundet til TCR. Proteinkomplekset består av CD3-subenheter, som hos fisk består av en $\gamma\delta$ -kjede, en ϵ -kjede og en ζ -kjede (Moore et al., 2005). Aktivering av T-cellen skjer når TCR/CD3-komplekset gjenkjenner antigenet (Nam et al., 2003). T-cellerreseptoren skiller seg fra B-cellerreseptoren ved at BcR har evne til å gjenkjenne og binde antigenet, mens TCR gjenkjenner antigen-fragmenter presentert av MHC-molekylet (Murphy & Weaver, 2017).

$\alpha\beta$ T-celler kan deles i to grupper basert på hvilken ko-reseptor som er uttrykt på celleoverflaten. CD8⁺ T-celler gjenkjenner antigen-fragmenter presentert av MHC klasse I molekyler mens CD4⁺ T-celler gjenkjenner antigen-fragmenter presentert av MHC klasse II molekyler (Castro et al., 2011; Murphy & Weaver, 2017). Cytotoksiske T-celler (CTLs) uttrykker CD8 (CD8⁺) ko-reseptorer på celleoverflaten og har evne til å binde seg til MHC klasse I molekyler som er til stede på de fleste celler med kjerne. Cytotoksiske celler er en viktig beskyttelsesmekanisme mot virus og intracellulære bakterier (Somamoto et al., 2014). Fragmenter av virale proteiner som er presentert av MHC klasse I på celleoverflaten blir identifisert av cytotoksiske effektor-celler (CD8⁺). CTLs bærer granuler som inneholder cytotoksiske effektor-proteiner som perforiner, granzymmer og granulysin (Murphy & Weaver, 2017; Somamoto et al., 2014). Perforiner danner porer i membranen på målcellen og danner inngang for andre komponenter av cytotoksiske granuler, og kan forårsake apoptose av infiserte celler (Murphy & Weaver, 2017). En annen populasjon av T-lymfocytter består av T-hjelpe (T_h) celler. I motsetning til cytotoksiske T-celler mangler disse evne til å uskadeliggjøre patogener på egen hånd, men de har evne til å stimulere andre celler i det adaptive immunforsvaret, som makrofager og B-celler, samtidig som de har evne til å mobilisere cytotoksiske T-celler for eliminasjon av infiserte celler (Jonson & Lewis, 2002). T-hjelpeceller uttrykker CD4 overflateprotein (CD4⁺) og gjenkjenner fragmenter av antigener presentert av MHC klasse II molekyler. T_h -celler i teleoster er strukturelt like til T_h -celler i pattedyr og funksjonen antas å være liknende. Naive T-celler aktiveres av antigen-presenterende celler (APC) som dendritiske celler, makrofager eller B-celler og utvikler seg til forskjellige effektor T-cellegrupper betegnet som T_h1 , T_h2 , T_h17 og regulatoriske T-celler (iTreg) som opprettholder homeostase (Secombes & Wang 2013). Hver gruppe av T_h -celler

skiller ut forskjellige typer cytokiner som øker immunresponsen til andre celler involvert i det adaptive immunsystemet (Ashfaq et al., 2019; Castro et al., 2011; Moore et al., 2010). Hver gruppe av T_h-celler gir ulik respons til forskjellige patogener. For eksempel beskytter T_h1-celler verten mot intracellulære bakterier, virus og sopp og kan skille ut interferon γ (IFN γ) og interleukin (IL-2), mens T_h2- i likhet med T_h17-celler gir respons når ekstracellulære patogener er til stede (Ashfaq et al., 2019; Castro et al., 2011). Interleukiner som skilles ut av T_h2-celler aktiverer immunglobulinproduksjon i B-celler (Jonson & Lewis, 2002). Etter at infeksjonen har blitt eliminert blir noen av T-cellene til «hukommelsesceller» som vil gi spesifikk immunrespons ved gjentatt møte med samme patogen. Når «hukommelses» CD8⁺ celler blir aktivert blir de til cytotoksiske celler, mens aktiverte CD4⁺ «hukommelsesceller» kan deles i to grupper: effektor CD4 som rekrutteres til betennelsesstedet eller til «central memory cell» som omdannes til effektorceller når de møter antigenet (Travers & Walport, 2001).

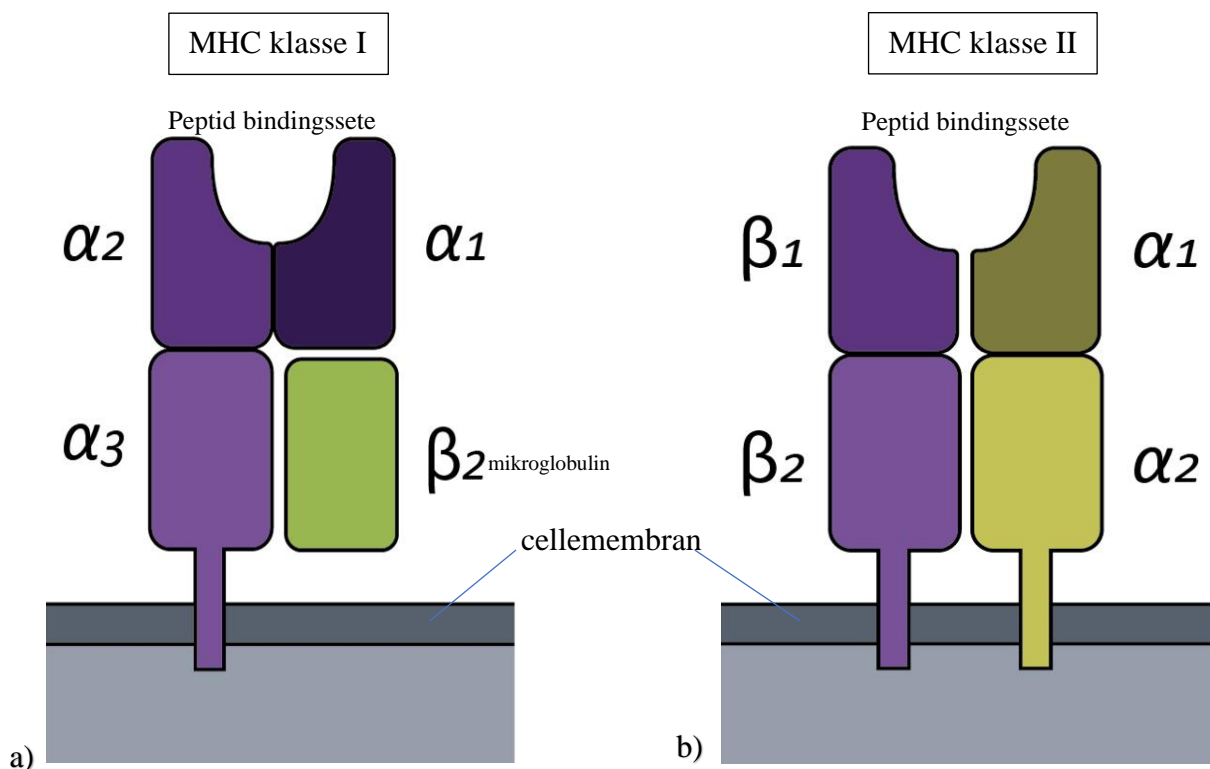
1.4.4.3 MHC klasse I og MHC klasse II molekyler

«Major Histocompatibility Complex» (MHC) er en stor region i genomet hos pattedyr, som blant annet koder for MHC klasse I og MHC klasse II molekyler (Wilson, 2017). Hos teleoster er MHC I og II molekyler kodet i to forskjellige regioner i genomet (Grimholt, 2016). Torskefisker mangler MHC II, men har MHC I (Rønneseth 2015; Star & Jentoft, 2012). Strukturen til MHC klasse I og MHC klasse II molekyler ligner, og begge kan gjenkjennes på basis av en langstrakt fordypning på overflaten som binder peptidfragmenter og presenterer disse til T-celler (Murphy & Weaver, 2017).

MHC klasse I molekyler er uttrykt på alle celler med kjerne og hos teleoster ble de først identifisert i karpe (Chen et al., 2010). Molekylet består av to polypeptidkjeder: en alfa-kjede med en transmembran/cytoplasmisk hale og en beta2-mikroglobulindel uten transmembranforankring, som vist i Figur (1.1) a) (Grimholt, 2016; Murphy & Weaver, 2017). Alfakjeden består av tre domener, α_1 , α_2 og α_3 , der α_3 -domenet danner bindingssete for T-celler med CD8 ko-reseptor (Murphy & Weaver, 2017; Nakanishi et al., 2011).

MHC klasse II molekylet består av to polypeptidkjeder, alfa (α) og beta (β), som begge er forankret i cellemembranen. Hver sub-enhet kan videre deles i α_1 og α_2 domener, og β_1 og β_2 domener, som vist i Figur (1.1) b) (Murphy & Weaver, 2017). β_2 er bindingssete for T-celler med CD4 ko-reseptor. MHC klasse II molekyler er til stede på profesjonelle APC-celler og involvert i kommunikasjonen mellom immunceller i det adaptive immunsystemet. MHC assosieres med betennelse (Jones et al., 2006).

Figur (1.1)



Figur 1.2 Skjematisk struktur til MHC klasse I og II. a) MHC I forankret i cellemembranen med α -kjeden, b) begge MHC II domenene α og β er forankret i cellemembranen.

1.4.4.4 Humoral immunrespons

Antistoffer er essensielle i beskyttelsen av verten mot ekstracellulære patogener og viktige for å begrense intracellulære infeksjoner (Murphy & Weaver, 2017). Antistoffene produseres av plasmaceller, som utvikles fra aktiverte B-celler. Naive B-celler kan aktiveres på to måter: direkte via møte med antigen, eller ved hjelp av T-hjelpeceller. Antigen-fragmenter kombineres med MHC klasse II proteiner og presenteres på celleoverflaten av APC. T-hjelpeceller med CD4 ko-reseptorer gjenkjenner antigenet og binder seg til MHC II molekyler (Wilson, 2017). APC skiller ut signalmolekylet interleukin-1 (IL-1) som aktiverer T-hjelpeceller. Den aktiverte T-cellen deler seg, noe som resulterer i mange T-celler med spesifikk reseptor mot antigenet som ble presentert av APC. For at en B-celle skal aktiveres av antigenet må dette bli presentert til T-hjelpeceller. Immunglobuliner binder patogenet og komplekset kan bli tatt opp ved «reseptor mediated endocytose». Patogenet brytes ned ved

hjelp av lysosom, og peptidfragmenter presenteres på celleoverflaten av MHC klasse II molekyler (Murphy & Weaver, 2017). T-hjelpeceller gjenkjenner antigenet som er presentert på B-cellens overflate og skiller ut signalcytokiner som aktiverer B-cellen. Dette resulterer i hurtig deling av B-cellene, som enten blir til plasmaceller som skiller ut antistoff mot det spesifikke antigenet de ble aktivert av, eller blir til «hukommelses-celler» som ved senere møte med samme patogen vil produsere antistoffer hurtigere og gi spesifikk immunrespons (Mashoof & Criscitiello, 2016).

1.4.4.5 Immunglobuliner

Immunglobuliner (Ig) som skilles ut av cellene betegnes som antistoff, og er blant de mest tallrike proteinene som forekommer i blodet (Jonson & Lewis, 2002). Ig forekommer for øvrig som membranbundne reseptorer på B-celler (BcR) (Travers & Walport, 2001). Immunglobuliner er glykoproteiner som har en Y-formet struktur og er bygd opp av fire polypeptid-kjeder: to identiske tunge kjeder (H) og to identiske lette kjeder (L) som holdes sammen med kovalente bindinger (Mashoof & Criscitiello, 2016; Murphy & Weaver, 2017). De øverste «grenene» av Y-strukturen er variable og utgjør bindingssetet til antigenene mens nederste del av «stammen», kalt konstantregionen, kommuniserer med effektorceller (Mashoof & Criscitiello, 2016; Murphy & Weaver, 2017).

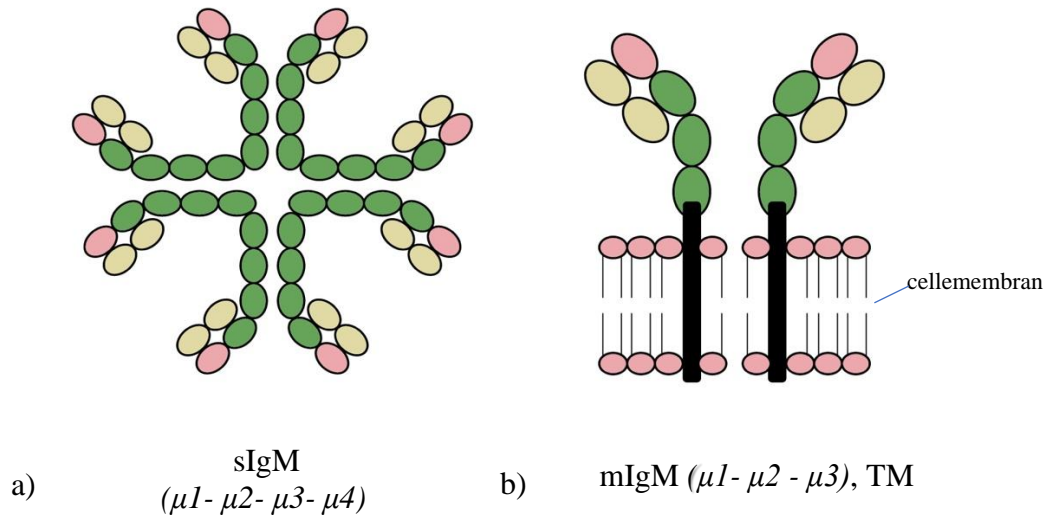
Strukturen til immunglobuliner kan også defineres ved å dele den opp i fragmenter.

«Grenene» i det Y-formede immunglobulinet danner «Fab» («fraction antigen binding») og består av øverste del av de to tunge kjedene og hele de lette kjedene, mens «stammen» kalles for «Fc» («fraction crystal») og består av de to identiske tunge kjedene. Fab-fragmentene binder antigenet, mens Fc-fragmentet bestemmer isotypen til immunglobulinet (Page et al., 2013).

Naive B-celler aktiveres når antigenet bindes til membranbundne immunglobuliner på B-celler og kan videre differensieres til effektorceller som har evne til å produsere antistoffmolekyler, eller til «hukommelses-celler» (Jonson & Lewis, 2002). B-celler aktiveres når antigenet blir presentert ved hjelp av antigenpresenterende celler (APC) som presenterer fragmenter av antigenet på MHC klasse II molekyler (Hoffman et al., 2016; Murphy & Weaver, 2017). «Hukommelsesceller» har lang levetid og har evne til å gi hurtig og sterkere immunrespons ved andregangs eksponering til samme antigen, ved å omdanne seg til plasmaceller og skille ut Ig mot det antigenet de ble aktivert av (Jonson & Lewis, 2002).

Immunoglobuliner er klassifisert i spesifikke isotyper på grunnlag av strukturen til konstant region (Magnadóttir, 2010). Hos teleoster finnes det tre Ig-isotyper: IgM, IgT og IgD/Z (Hikima et al., 2011; Hordvik, 2015). IgM var det første immunoglobulinet som ble karakterisert i teleoster. IgM forekommer i to former, som membranbundet monomer (mIgM) på celle-overflaten av B-celler, eller som tetramer i serum og mukus (sIgM), som vist i Figur (1.2) (Kaattari et al., 2013; Schroeder & Cavacini, 2009; Mashoof & Criscitiello, 2016; Mochida et al., 1994). To sub-typer av IgM har blitt karakterisert i laksefisk (Hordvik, 2015). Hos teleoster er IgM også involvert i mukosal immunitet (Hordvik, 2015). Studier viser at forskjellige fiskearter inneholder ulike mengder av IgM i serum, fra 800 - 9000 µg/ml, og forskjellige faktorer som alder, størrelse, habitat og tilstedeværelse av infeksjoner kan påvirke mengden av IgM (Hordvik, 2015; Kaattari et al., 2013; Mashoof & Criscitiello, 2016). Rollen til IgM er antatt å være lik i alle vertebrater den finnes hos: den har evne til å nøytralisere patogener, favorisere fagocytose og aktivere komplementsystemet (Flanjik & Kashara, 2010; Shroeder & Covivani, 2009). I høyerestående vertebrater er strukturen til IgM en pentamer og Fc-region holdes sammen med en J-kjede som bindes til IgM med disulfid-bindinger (Shroeder & Covicini 2009; Murphy & Weaver, 2017). I teleoster består IgM av fire monomer-enheter som er organisert i en tetramer og J-kjeden er fraværende. Det har blitt foreslått at den tunge kjeden kan erstatte funksjonen til J-kjeden (Kaattari et al., 2013).

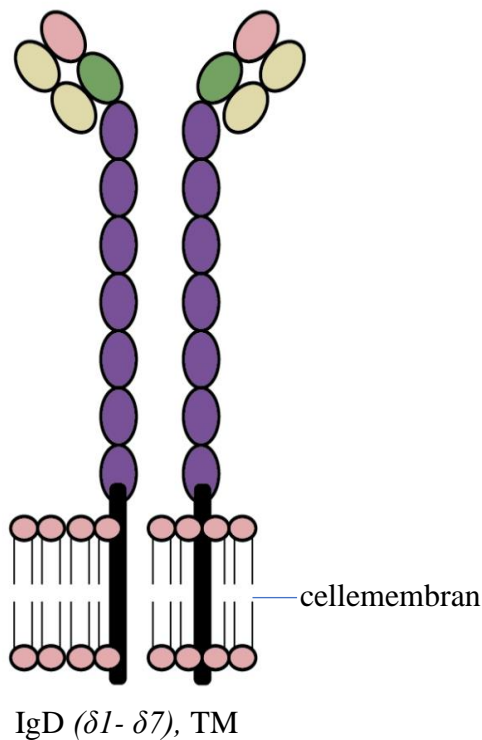
Figur (1.2)



Figur 1.2 Skjematisk illustrasjon av teleost IgM. a) Sekretorisk IgM (sIgM) består av fire monomerer hos teleoster, der hver monomer har to identiske lette kjeder og to identiske tungkjeder. De konstante Ig-domenene i tungkjeden ($\mu 1 - \mu 4$) er merket i mørkegrønn farge. b) Membranbundet monomer (mIgM) består av tungkjeder med tre konstante domener ($\mu 1 - \mu 3$) merket med mørkegrønn, en transmembran del (TM) og en kort cytoplasmisk hale, merket med svart strek som går gjennom cellemembranen.

IgD forekommer som monomer og er membranbundet på celleoverflaten av modne B-celler. Som oftest er IgD uttrykt sammen med IgM på samme B-lymfocyt, som resultat av alternativ mRNA-spleising. Slike celler omtales som IgM⁺/IgD⁺ celler (Edholm et al., 2011; Murphy & Weaver, 2017). IgD-isotypen har blitt funnet i de fleste vertebrater, noe som tyder på at IgD er en av de eldste klassene av Ig-molekyler (Edholm et al., 2011). Hos teleoster består den tunge kjeden av IgD av et μ -domene ($\mu 1$) og et forskjellig antall δ -domener, en transmembrandel, og en kort cytoplasmisk hale, som vist i Figur (1.3). Hos atlantisk laks og amerikansk elvemalle har det blitt identifisert syv unike immunglobulin domener ($\delta 1 - \delta 7$) (Hordvik, 2002).

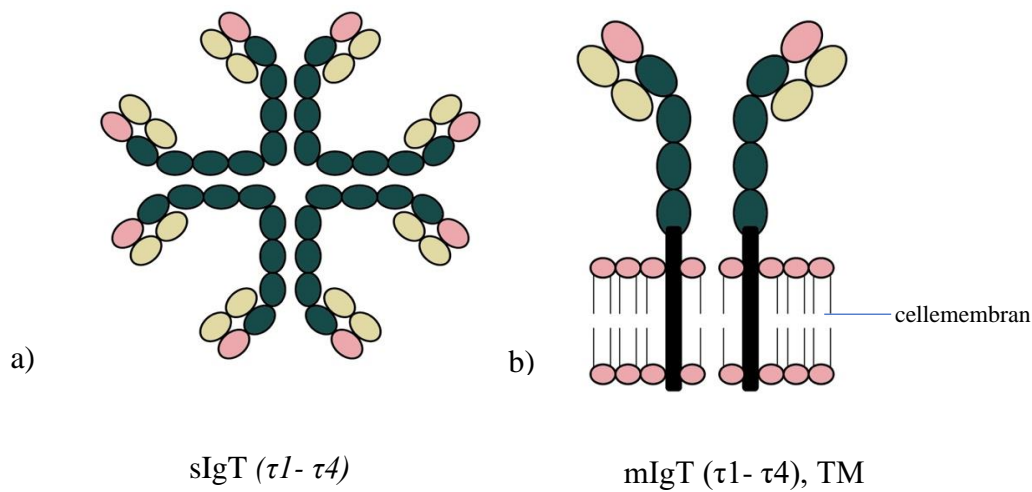
Figur (1.3)



Figur 1.4 Skjematisk illustrasjon av membranbundet IgD. $\mu 1$ -domenet er merket med grønn, og $\delta 1$ - $\delta 7$ domenene er merket med lilla. Transmembrandelen (TM) og cytoplasmisk hale er merket med svart strek som går gjennom cellemembranen.

IgT er den siste isotypen som har blitt kartlagt i vertebrater og synes å være til stede kun hos teleoster (Salinas et al., 2011). Funksjonen til IgT ligner IgA i høyerestående vertebrater (Rønneseth et al., 2015). Den nye isotypen ble først funnet hos regnbueørret (IgT) og sebrafisk (IgZ). Homologe gener er til stede i de fleste arter av teleoster og flere subtyper av IgT kan være til stede hos samme art (Salinas et al., 2011). Hos regnbueørret forekommer IgT som monomer i serum og som polymer i mukus (Salinas et al., 2011). Som oftest består IgT av fire konstante domener ($\tau 1$ - $\tau 4$), men antallet domener kan variere fra art til art. Stingsild har tre τ -domener, mens hos karpe er både $\tau 2$ og $\tau 3$ fraværende (Salinas et al., 2011; Mashoof & Criscitiello, 2016). IgT antas å ha en spesiell rolle i mukosale vev og epiteloverflater (Flanjk, 2018). Forsøk i regnbueørret har indikert at pIgR er involvert i IgT-transport til mukosale områder (Zhang et al., 2010). Figur (1.4) viser skjematisk illustrasjon av sekretorisk IgT (sIgT) og membranbundet IgT (mIgT) i teleoster.

Figur (1.4)



Figur 1.4 Skjematisk illustrasjon av teleost IgT. a) Sekretorisk IgT (sIgT) finnes som tetramer i mukus, og hver tungkjede består av fire konstante domener ($\tau 1 - \tau 4$), merket i mørkegrønn. b) Membranbundet IgT (mIgT) finnes som monomer forankret på overflate av B- celler, og tungkjeden består av fire konstante domener ($\tau 1 - \tau 4$) merket i mørkegrønn, Transmembrandelen (TM) og cytoplasmisk hale er merket med svart strek som går gjennom cellemembranen.

1.4.4.6 pIgR- og pIgRL-molekyler

pIgR er et transmembran-protein som er spesielt høyt uttrykt i mukosale områder og vev som deltar i immunsystemet. pIgR er involvert i transport av immunglobuliner gjennom epitelet til mukosale områder (Hamuro et al., 2007; Kaetzel, 2005). Hos pattedyr består pIgR av fem immunglobulin-liknende domener (ILD1-5), en transmembran-region (TM) og en cytoplasmisk hale (Cy). pIgR transporterer IgA og IgM over epitelet til mukosale områder ved å feste seg til J-kjeden i immunglobulinet (Rombout et al., 2008; Murphy & Weaver, 2017). pIgR sammen med immunglobulinet danner en sammensatt struktur (kompleks) som ved endocytose transporteres over til mukosale områder for interaksjon med antigener (Murphy & Weaver, 2017). pIgR har blitt klonet fra en rekke teleoster; kinesisk værål (*Misgurnus anguillicaudatus*), karpe (*Cyprinus carpio*), japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Studier viser at hos disse artene består pIgR av to ILD som ligner mest på ILD1, og ILD5 hos pattedyr (Hamuro et al., 2007; Liu et

al., 2019). Hos teleoster er funksjonen til pIgR antatt å tilsvare det man kjenner til fra pattedyr, dvs å binde IgM og IgT, og transportere disse molekylene over til mukosale områder (Salinas & Parra, 2015). Studier i karpefisk har vist at pIgR er høyt uttrykt i lymfoide vev som hodenyre, tymus, milt og baktarm, mens gjeller og hud viser lave verdier av pIgR (Rombout et al., 2008). Hos fugu (*Takifugu rubripes*) derimot er pIgR uttrykt i høye nivåer også i gjeller og hud, i tillegg til lymfoide vev (Hamuro et al., 2007). Forsøk i regnbueørret har indikert tilstedeværelse av pIgR i gjellemukus (Xu et al., 2016). Figur (1.5) viser skjematisk illustrasjon av pIgR, med to ILD.

Figur (1.5)



Figur 1.5. Skjematisk struktur til pIgR i teleoster, med to ILD markert i grønn, signal peptid markert i rødt, og transmembransegment markert i blått.

Hos flere teleoster har det blitt funnet molekyler med liknende struktur som teleost pIgR, men kunnskapen om pIgRL er svært begrenset. I likhet med teleost pIgR består pIgRL typisk av to ILD. Hos atlantisk laks er pIgRL til stede i vev som er dekket av mukus, som gjeller og hud. Hos laksefisk øker pIgRL nivået under infeksjon av lakselus (Tadiso et al., 2011). Hos karpe forekommer pIgRL i løselig form («soluble immunoglobulin-like receptor») som skilles ut fra makrofager (Ribero et al., 2011). Hos japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) har pIgRL blitt funnet i forskjellige vev som deltar i immunologiske prosesser, samt i mukosale områder. pIgRL er høyest uttrykt i hud, gjeller, milt og baktarm. For å undersøke om dette molekylet deltar i immunresponser ble fisken vaksinert med *V. anguillarum*, noe som førte til økt nivå av pIgRL i alle vev. pIgRL i flyndre har også vist evne til å binde IgM. Disse dataene indikerer at pIgRL i flyndre kan være involvert i mukosal immunitet (Liu, et al., 2019). I sebrafisk har det blitt identifisert en genfamilie som består av 29 gener som ligner på pIgR, ko-lokalisert med pIgR.

Sebrafisk pIgRL er til stede i lymfoide celler, i motsetning til pIgR. I likhet med andre teleoster uttrykkes pIgRL i sebrafisk-vev som er involvert i immunsystemet, i tillegg til at det kan lokaliseres i ovarier (Kortum et al., 2014). Noen pIgRL-molekyler i sebrafisk har vist seg å binde fosfolipider, men ikke immunglobuliner. pIgRL har forøvrig strukturlikhet til CD300, CD300-like og TREM-like reseptorer hos mennesker (Kortum et al., 2014; Tadiso et al., 2011).

1.4.5 Immunologiske studier hos berggyll (*Labrus bergylta*)

Berggyll har etablert seg som en av de mest brukte rensefiskene i Norge. For å dekke etterspørselen av leppefisk har det blitt satt i gang oppdrett av denne fiskearten. For å begrense tap av rensefisk på grunn av sykdommer er det nødvendig å utarbeide artsspesifikke vaksiner. Flere studier har blitt utført for å karakterisere immunforsvaret hos berggyll og utvikle reagenser for å måle immunresponser (Bilal et al., 2019; Bilal et al., 2016; Bilal et al., 2018; Ronneseth et al., 2014). Flere typer leukocytter har blitt isolert og identifisert hos berggyll (Renneseth et al., 2014). Fagocyterende celler som makrofager/monocytter og granulocytter er til stede i lymfoide vev og i blod. Alle tre typer granulocytter er til stede hos berggyll, med rikelig antall nøytrofile og eosinofile granulocytter, mens basofile granulocytter er den minste populasjonen av de granulære cellene. Ulike populasjoner av leukocytter er beskrevet hos berggyll (Renneseth et al., 2014), og flere komponenter av det adaptive immunsystemet har blitt kartlagt, blant annet immunglobuliner som IgM, IgT og IgD og T-cellerreseptor sub-enhetene TCR α , TCR δ og CD3 ϵ (Bilal et al., 2016; Bilal et al., 2019). IgM rensset fra berggyll og rognkjeks ble brukt for å produsere antisera i kanin (Bilal et al., 2016). IgM-konsentrasjonen i berggyll ble målt til 13,5 mg/ml i serum og utgjorde rundt 36% av totalprotein-mengden (Bilal et al., 2016). Molekylvekten av tungkjeden i berggyll ble målt til 75 kilo Dalton (kDa), mens den lette kjede ble estimert til å være 25-27 kDa (Bilal et al., 2016). Under karakteriseringen av TCR α og β kjedene i berggyll ble somatiske hypermutasjoner (SHM) oppdaget i α -kjeden (Bilal et al., 2018). SHM forårsaker hyppige punktmutasjoner i den variable regionen av Ig-molekyler, men har tidligere vært antatt å ikke forekomme i TCR (Bilal et al., 2018).

Uvanlig høy uttrykking av IgM i baktarm hos berggyll ble oppdaget da IgM, IgD, IgT, TCR α , TCR δ og CD3 ϵ mRNA ble kvantifisert i forskjellige organer (Bilal et al., 2019). Denne studien viste høyere nivå av IgM i baktarmen enn i hodenyre, og generell høy tilstedeværelse av IgM i berggyll, sammenlignet med andre teleoster. I tarmen hos berggyll synes immungen-aktiviteten generelt å være mye høyere enn hos andre teleoster, noe som kan skyldes at

berggylt mangler magesekk i fordøyelseskanalen. Uttrykkingen av IgT og IgD var høyest i milt og mer jevnt fordelt i andre organer, med hodenyre som nest høyest. CD3 ϵ viste et høyt uttrykkningsnivå i baktarmen, sammen med TCR α , mens TCR δ var mer jevnt fordelt over hele tarmen (Bilal et al., 2018).

Målet med oppgaven (2)

Hovedmål:

Hovedmålet med denne masteroppgaven var å karakterisere pIgRL («polymeric Immunoglobulin reseptor-Like») -genet i berggylt og uttrykkmønsteret til dette i en serie av vev.

Delmål:

- Prøvetaking av berggylt, isolering av total-RNA og cDNA-syntese
- Kloning og sekvensering av cDNA
- Analyse av translatiserte peptidsekvenser, domener og glykosyleringssteder
- Analyse av relativ mengde mRNA i ulike vev ved hjelp av RT-qPCR

Materiale og metoder (3)

3.1 Prøvetaking

Berggylt (*Labrus bergylta*) som ble brukt i forsøkene var både fra oppdrett og villfangst. Berggylt oppdrettet på forskningsstasjonen på Austevoll (Havforskningsinstituttet) ble dissekert på forskningsstasjonens laboratorium. Berggylt fra MOWI sitt oppdrettsanlegg i Øygarden og villfanget berggylt fra Tellevik (i Bergen) ble dissekert på laboratoriet på Høyteknologisenteret (HIB) i Bergen.

Fiskene fra Austevoll ble avlivet med overdose av Benzocain. Fiskene fra Øygarden og Tellevik ble avlivet med slag mot hode. Følgende organer ble dissekert ut av fisken: gjelle, fornyre, milt, lever, midttarm, baktarm, muskel og hud. Disseksjon ble utført med steril skalpell/pinsett. Skalpellbladet ble vasket og brent av mellom de forskjellige vevene, og skiftet mellom hver fisk. Vevsbiter på ca. 2x2x2 mm ble plassert i separate merkede 2mL eppendorfrør fylt med bevaringsmediumet RNAlater[®]. Prøvene ble oppbevart 24 timer i kjøleskap ved 4° C, og deretter flyttet til -20° C fryser på Høyteknologisenteret. Dissekering ble utført under veiledning av PhD-student Angela Etayo eller veileder Ivar Hordvik. Noen av fiskene på forskningsstasjonen på Austevoll var små i størrelse, noe som gjorde det vanskelig å få gode vevsprøver fra nyre. Det ble derfor tatt prøver fra ekstra fisk i noen tilfeller, slik at alle organer i organpakken ble representert.

Prøveuttakene er presentert i tabell (3.1)

Figur (3.1)



Figur 3.1. Fullvoksen, villfanget berggyllt med indre organer eksponert. Vev dissekert for denne studien er merket på bildet. 1=Gjelle, 2=Nyre, 3=Lever, 4=Middtarm, 5=Baktarm, 6 Milt= Ikke synlig på bilde, befinner seg bak gonadene 7= muskel, 8= hud. Eget foto

Tabell 3.1 *Uttak av fisk*

Dato og sted:	Individ:	Vekt (g):	Lengde (cm):	Full organpakke	Kommentar:
12.02.2020, Austevoll	F2	19	24	x	
	F4	21	27	x	
	F5	20	25	x	
	F6	21	27	x	
09.03.2020, Austevoll	F10	20,4	11	-	Mangler nyre
	F11	14,2	9,5	-	Mangler nyre
	F12	10,7	11	-	Mangler nyre
	F13	13,9	9,5	-	Mangler nyre
	F21	11,2	10	-	Kun nyre
	F22	12,2	11	-	Kun nyre
17.06.2020 Øygarden	Ø-1	~100	17,5	x	Vekten upresis
	Ø-2	~100	16,5	x	Vekten upresis
	Ø-3	~100	16,5	x	Vekten upresis
	Ø-4	~100	16,5		Mangler gjelle, muskel, hud
18.09.2020, Televik	T-1	1009	49	x	
	T-2	940	40	x	

*Fra hver fisk ble det tatt ut en organpakke bestående av følgende vev: Gjelle, lever, milt, fornyre, midttarm, baktarm, muskel og hud. Avvik fra full organpakke er notert i kommentarfeltet i tabellen.

3.2 RNA-rensing

RNA-rensing fra vev ble utført ved hjelp av denatureringsløsningen TRIzol[®]. TRIzol[®] bevarer RNAs integritet og oppløser cellekomponenter under vevshomogeniseringen slik at RNA kan brukes videre i syntese av cDNA.

Vevsbitene i RNAlater[®] ble tatt ut av frysen, tint og plassert i 2 mL eppendorfrør som inneholdt en steril stålkule. Videre ble 1 mL TRIzol[®] tilsatt og blandingen homogenisert i 3 minutter ved risting (Tissuelyser II, QIAGEN). Vevsbitene var da blitt til en homogen suspensjon. Prøvene ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur og 0.2 mL kloroform ble tilsatt til hver prøve, noe som førte til fase-separasjon. Den homogene løsningen ble sentrifugert i bordsentrifuge (Heracus Fresco 21, Thermo Fisher Scientific) i 15 minutter på 4°C ved 12 000 relativ sentrifugalkraft (Relative Centrifugal Force, rcf). Etter sentrifugeringen var to faser klart synlige, den øvre vandige fasen, kalt supernatant inneholdt RNA, mens DNA og proteiner var samlet i den nederste organiske fasen. Supernatanten (400 µL) ble overført med pipette til et 1.5mL eppendorfrør med 500 µL isopropanol som fører til RNA presipitasjon ved inkubering ved romtemperatur i 10 minutter. Etter inkubasjonen ble rørene sentrifugert ved 12 000 rcf i 15 minutter ved 4 °C. Pelleten som inneholdt salter og RNA var nå synlig. Pelleten ble vasket med 1 mL 75% etanol (EtOH), slik at salter fra pellet ble fjernet. Røret ble sentrifugert ved 12 000 rcf i 5 minutter på 4 °C, etanolen fjernet med pipette og prosedyren gjentatt to ganger. Etter siste vask ble rørene lagt til å tørke slik at restene av etanol fordampet. Nuklease-fritt vann (QIAGEN) ble varmet til 70° C og 50 µl av vannet ble tilsatt til rørene for å løse opp pelleten. Rørene ble plassert i Vortexer for å løse opp pelleten fullstendig. Til prøvene av lever ble det tilsatt 100 µl nuklease-fritt vann siden disse inneholdt mer RNA.

3.3 Analyse av RNA mengde og kvalitet

For å analysere kvalitet, renhet og måle konsentrasjonen av RNA ble det brukt et NanoDrop 2000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific). Mikrovolum UV- Vis ble brukt til å måle prøvenes absorbans ved spesifikke bølgelengder og estimere mengden av det relevante molekylet. Spektrofotometeret gir forholdet mellom absorbans ved bølgelengde 260 nanometer (nm) og 280 nm. Et forhold som varierer fra 1.80-2.00 blir ansett som god standard og RNA prøven anses som ren i dette intervallet. Hvis tallet på forholdet er betydelig lavere kan det gi indikasjon på at prøven inneholder store mengder protein i forhold til nukleinsyrer

eller er kontaminert med andre forbindelser som blir absorbert ved 280 nm. Kurven som blir gitt av programvaren (ND-1000) bør ha en «fin topp» på 260 nm og ingen topper andre steder. Alt som er under 1.7 bør ikke brukes videre i biologiske analyser. Spektrofotometeret gir også data om absorbans ved 260 og 230 nm. Disse dataene viser kvalitet på nukleinsyrer. God standardverdi er fra 2.00- 2.2 eller høyere. Lavere verdi kan indikere tilstedeværelse av salter eller andre molekyler som har evne å absorbere lys i området 230 nm.

RNA ble målt ved å applikere 1,5 µl RNA, løst i vann, på måleenheten til spektrofotometeret. Data om prøvens renhetsforhold og mengde RNA ble videre lagret i et dataprogram. Etter Nanodrop-målinger av alle RNA-prøvene ble de lagret ved - 80° C, før videre bruk i komplementær DNA (cDNA) syntese og revers transkripsjon, forkortet (RT).

3.4 cDNA-syntese

Et utvalg av RNA-prøvene ble brukt til cDNA-syntese. Etter at mengde RNA i hver vevsprøve var målt ble uttaket til cDNA-syntese beregnet. Det ble brukt 2 µg total-RNA fra hvert vev, i en 20µL reaksjon. Superscript® II (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) reagenser ble brukt under dette studiet og protokollen for Superscript II ble benyttet i cDNA-syntesen. Det ble laget 2 mastermixer. Tabell (3.2) viser mengden reagenser for en reaksjon. Den første mastermixen (I) inneholdt primer, oligo-dT (12-18) og dNTPs, den andre (II) bestod av buffer, DTT og RT-enzym. I første trinn ble mastermix I tilsatt rørene som inneholdt fortynnet RNA. MiniAmp Thermal cycler (Thermo Fisher) ble satt på 65° C i 5 minutter. Etter 5 minutter ble PCR-maskinen stoppet, rørene satt på is, og mastermix II tilsatt til hvert rør. Følgende temperaturprofil for cDNA-syntese ble benyttet: 42° C i 50 min, 70° C i 15 min. Som siste steg i cDNA-syntesen avkjølte PCR-maskinen prøvene til 4° C. Prøvene ble videre lagret i -20° C fryser for videre forsøk.

Tabell 3.2 Reagenser for 20 µl cDNA-reaksjon

Reagens	[stock]	Volum µL for 1 reaksjon
Primer, Oligo dT (12-18)	10 µM	1
Templat+ nukleasefritt vann	RNA, max 10 µl/5 µg	12
dNTP	10 mM	1
Buffer	x5	4
DTT	0,1 M	1
RT enzym	5 U/ul	1

3.5 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

PCR muliggjør amplifisering av DNA-fragmenter ved bruk av spesifikke primere og en termostabil polymerase som stammer fra bakterien *Thermus aquaticus*. På kort tid blir det oppkopierte en betydelig mengde av ønsket PCR-produkt som kan brukes videre i molekylærbiologiske undersøkelser som kloning og sekvensering.

Under dette studiet ble det designet 6 gen-spesifikke primerpar på basis av den predikerte sekvensen for pIgRL i berggylt (som var tilgjengelig i GenBank; NCBI). Primere ble designet fra ekson/ekson-overganger for å forhindre amplifikasjon av genomisk DNA. «Stock»-løsninger av primere ble fortynnet med nuklease-fritt vann (1:10). Tabell (3.3) viser primere brukt under dette studiet.

Det ble brukt AccuPrime™ Taq DNA polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) reagenser. For å utføre PCR-reaksjonene ble det laget mastermix av PCR-buffer, Taq polymerase, utvalgte forward og reverse primere og nuklease-fritt vann. Mastermiksen ble fordelt i separate rør, og cDNA (fortynnet 1:10) ble tilsatt til hvert rør. Tabell (3.4) viser mengden reagenser for en reaksjon.

Rørene ble satt i PCR-maskin (Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems) med følgende temperaturprofil: 94° C i 2 min, fulgt av 30 sykluser med 94° C i 15 min, 55° C i 30 sek, 68° C i 1 min, 72° C i 7 min. Etter avkjøling på 4° C i PCR-maskinen ble prøvene umiddelbart analysert ved gelelektroforese, og resterende løsning ble lagret i -20° C fryser for videre forsøk.

Tabell 3.3 Primere brukt i amplifikasjon av pIgRL

Primer navn	Forward-primer	Reverse-primer
F3/R3	5'- TGTCATCCTGTGTATTGCTT-3'	5'- AACATCATTGCTACCGAGTC-3'
F4/R4	5'- AGCAGGCACTGGTCACATCT-3'	5'- GCACCACTCATTGACTTCCG-3'
F5/R5	5'- GGGACATACTGGTGTGGTTA-3'	5'- GGATTTTGGTTCCTTGTGCTC-3'

Tabell 3.4 Reagenser for en 20 µl PCR reaksjon

Reagens	[stock]	Volum µL for 1 reaksjon
Buffer	x10	2
Forward primer	10 µM	0,5
Reverse primer	10 µM	0,5
Taq/ accuprime	5U/ul	0,1
Templat	cDNA 1:10	1
Nuklease-fritt vann	-	15,9

3.6 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en enkel metode som gjør det mulig å bestemme størrelsen av DNA-fragmenter. Det ble laget 2% agarose-gel av 4 gram agar og 200 ml 1x TAE-buffer (Tris Acetat EDTA). Agaren ble smeltet i bufferen ved hjelp av mikrobølgeovn, og så oppbevart i varmeskap på 60° C. Til 50 ml av ferdig laget agarose-gel ble det tilsatt 2µL med GelRedTM, et fargestoff som er fluorescerende når det bindes til nukleinsyrer. Den flytende gelen ble helt i gel-karet, og en kam med 10 brønner ble forsiktig plassert i øverste del. Gelen ble avkjølt i cirka 20 minutter. Så ble elektroforesekaret fylt med 1x TAE-buffer til anbefalt grense. 5µL av PCR-produktet ble blandet med 1µL 6x loading buffer og applisert på gelen med pipette. Loading-bufferen sørger for at PCR-produktet synker ned i brønnene. For å bestemme størrelsen på PCR-produktene ble det brukt «Smart Ladder» og «2- Log DNA Ladder» som inneholder DNA-fragmenter av kjent størrelse. Molekylvektmarkøren vist i appendiks. Molekylvektmarkøren ble pipettert i første og siste brønn. Gelen ble fotografert i UV-lys ved hjelp av Gel Logic Pro 212 (Thermo Fisher Scientific). Deretter ble bildet behandlet i Carestream MI programmet og lagret.

3.7 TOPO-kloning

TOPO TA kloning brukes for direkte innsetting av Taq-polymerase amplifiserte PCR-produkter i en plasmidvektor. Kloningen ble gjennomført ved bruk av «TA TOPO cloningTM kit» med pCRTM 4 vektoren (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). I første steg av kloningen ble 2 µl av PCR-produktet, 0,5 µL saltløsning (NaCl) og 0,5 µL TOPO-vektor blandet sammen i et 1,5mL eppendorfrør. Vektoren har komplementære T-overheng på 5` fosfat-endene. Disse binder seg til A-overheng på 3`hydroksyl-endene på PCR-produktet. Etter 5 minutter ble 1 µL av TOPO-blandingen tilsatt til kompetente *E. coli* bakterier slikt at

plasmidvektoren sammen med innsatt PCR-produkt kunne klones. Løsningen ble blandet forsiktig, satt på is i 10 minutter, og deretter satt i vannbad på 42° C i 30 sek. Kulde og varmebehandling svekker bakteriemembranen og gjør den mer permeabel. 125 µL romtemperert SOC bakterievekstmedium ble tilsatt og rørene satt i en bord-risteinkubator (Thermo Mixer compact, Eppendorf) ved 1200 rpm i 60 minutter. Bakterieløsningen ble overført til LB (Lysogeny broth) agar-plater med 100 ug/ml ampicillin. For å sikre tilfredsstillende antall enkeltkolonier ble 2 agarplater brukt per prøve. Henholdsvis 10 µL og 100 µL ble pipettert midt på platen og så spredd jevnt utover. Deretter ble skålene satt i inkubator på 37° C over natt.

Neste dag ble enkeltkolonier fra hver agarplate forsiktig løftet med sterile pipettespisser og flyttet over til PCR-rør som inneholdt 10 µL nukleasefritt vann. Videre ble det utført PCR-screening av koloniene. 10 µL av bakteriesuspensjonen ble varmebehandlet i PCR-maskin (Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems) i 5 min på 95° C før PCR med M13 forward og reverse primere. Tabell (3.5) viser mengde reagenser for hver reaksjon. Følgende temperaturprofil ble brukt: 94° C i 3 min, påfulgt av 30 sykluser med 94° C i 45 sek, 55° C i 30 sek, 72° C i 90 sek. Temperaturen ble deretter holdt på 4° C til programmet ble terminert. De amplifiserte produktene ble analysert ved 1% agarose gelelektroforese. Deretter ble aktuelle kloner valgt ut for videre karakterisering. Disse klonene ble dyrket opp i 15 mL rør som inneholdt 5 mL LB-medium og 100 ug/ml ampicillin. Rørene ble inkubert over natt i en risteinkubator på 37° C. Plasmidrensing ble utført neste dag.

Tabell 3.5 Reagenser for 20 µL PCR koloni-screening

Reagens	[stock]	Volum µL for 1 reaksjon
Buffer	x10	2
dNTPs	10mM	0,5
MgCl ₂	50mM	0,6
Forward primer M13	10µM	1
Reverse primer M13	10 µM	1
Taq polymerase	5U/ul	0,1
Templat	Varmebehandlet bakterie	1
Nukleasefritt vann	-	13,8

3.8 Plasmidrensing

Isolering av plasmider ble utført ved bruk av «Plasmid Mini Prep Kit» (Macherey- Nagel, Germany) i henhold til produsentens protokoll.

2 mL eppendorfrør med bakteriekultur ble sentrifugert i bordsentrifuge (Heracus, Pico 21 elektrofuge, Thermo Fisher) ved 12 000 rfc i 30 sekunder. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet og 150 µL med buffer A1 tilsatt (resuspensjonsbuffer med RNase). Rørene ble vortexet for å resuspendere pelleten fullstendig. Så ble det tilsatt 250 µL med alkalisk lysis buffer A2 og rørene ble vendt opp og ned forsiktig 5 ganger. Rørene ble inkubert i 2 minutter ved romtemperatur, slikt at cellene gikk i lysis. Så ble rørene tilsatt nøytraliserende buffer A3 og rørene vendt opp og ned til løsningen ble gjennomsiktig. Deretter ble rørene sentrifugert ved 12 000 rfc i 3 minutter. NucleoSpin-kolonnen ble plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og supernatanten fra sentrifugeringen overført til kolonnen. Kolonnene/rørene ble plassert i sentrifugen og sentrifugert ved 2 000 rfc i 30 sekunder. Etter sentrifugering ble «flow-through» fra oppsamlingsrørene helt ut og kolonnene plassert tilbake i samlerørene. Så ble 450 µL med vaskebuffer AQ (som inneholder etanol) tilsatt til kolonnen og sentrifugert ved 12 000 rpm i 1 minutt. Etter sentrifugering ble oppsamlingsrørene kastet og kolonnene plassert i nye oppsamlingsrør og vasket en gang til med buffer AQ. Rørene ble sentrifugert ved 12 000 rcf i 2 minutter og oppsamlingsrørene kastet. Deretter ble Nucleospin-kolonnen plassert i 1,5 mL eppendorfrør og 50 µL av AE elusjonsbufferen tilsatt til kolonnen. Kolonnen ble plassert i eppendorfrøret og inkubert ved romtemperatur i 1 minutt, og deretter sentrifugert ved 12 000 rpm i 1 minutt. Etter sentrifugering ble kolonnen kastet. Kvaliteten og konsentrasjonen av plasmid-DNA ble målt med NanoDrop spektrofotometer. Plasmidene ble lagret på -20° C.

3.9 DNA-sekvensering

Det ble brukt Big Dye TMv.3.1 DNA (Invitrogen) reagenser til DNA-sekvensering.

Plasmidkloner ble sekvensert med henholdsvis M13 forward og M13 revers primer. To separate mastermixer med nuklease-fritt vann, BigDye v.3.1, sekvenseringsbuffer, og M13primer (forward eller reverse) ble fordelt i PCR-rør. Rørene ble satt på is og tilsatt templat. Templat inneholdt 200 ng DNA.

Tabell (3.6) viser mengde reagens for en reaksjon. Følgende temperaturprofil ble brukt: 96° C i 5 min, påfulgt av 25 sykluser med 96° C i 10 sek, 59° C i 5 sek, 60° C i 4 min, som anbefalt

i produsentens protokoll. Rørene ble deretter satt på is og 10 µL nuklease-fritt vann tilsatt til hver rør.

Avlesning av sekvensene ble foretatt på sekvenseringslaboratoriet ved Høyteknologisenteret i Bergen (HIB). Sekvensering ble utført ved hjelp av 3730XL analyser (Applied Biosystems).

Tabell 3.6 *Reagenser for 10 µL q v.3.1 Big Dye PCR reaksjon.*

Reagens	[stock]	Volum µL for 1 reaksjon
BigDye v.3.1.	x10	5,5
Sekvenseringsbuffer	x10	1
Primer M13 (F eller R)	10 µM	0,5
Nuklease- fritt vann	-	6,5
Templat	200 ng	1

3.10 Kvantitativ (q) PCR

qPCR ble basert på SYBR[®] Green (Applied Biosystems) reagenser, og prosedyren ble utført etter protokollen fra produsenten. SYBR[®] Green er et fluorescerende fargestoff som fluoresceres når det binder dobbeltrådig DNA (dsDNA). Når fargestoffet bindes til dsDNA gjennomgår det strukturelle forandringer og blir mindre mobilt, noe som får energien til å frigjøres som fluorescens. Dette gjør det mulig å måle mengden av dsDNA i hver prøve. Siden SYBR[®] Green har evne til å binde seg til all dsDNA er det viktig at smeltekurve-analyse utføres. Smeltekurve-analysen vil vise om det finnes annen dsDNA enn det som skal måles i prøven. cDNA ble fortynnet 1:10 med nuklease-fritt vann. Det ble laget mastermixer med gen-spesifikke primere, som er omtalt i avsnitt 3.5. For hvert enkelt primerpar ble det laget en separat mastermix. Mastermixen inneholdt nuklease-fritt vann, PCR-buffer (SYBR[®] Green), forward primer og reverse primer. Tabell (3.7) viser mengde reagens for en reaksjon. 8µl av mastermixen ble pipettert i hver brønn i et MicroAmp[®] Fast Optical 96-brønners brett (Life Technologies). Deretter ble 2 µl av fortynnet cDNA tilsatt, med duplikat for hver vevsprøve. For å kontrollere potensiell kontaminasjon av reagenser ble det tilsatt negativ kontroll («no-template control», NTC) for hvert primerpar, det ble gjort ved å erstatte cDNA med 2 µl nuklease-fritt vann. Før brettet ble satt i qPCR-maskinen, ble innholdet i brønnene sentrifugert ned (Axygen). qPCR-maskinen ble satt på programmet «standart cycling» med følgende temperaturprofil : 50° C i 2 min, 95° C i 2 min, 40 syklus av 95° C i 15 sek, 60° C smeltekurve. Etter qPCR-reaksjonen ble resultatene analysert med programvaren Microsoft Excel.

Tabell 3.7 Reagenser for 10 µL qPCR reaksjon.

Reagens	[stock]	Volum µL for 1 reaksjon
Nuklease- fritt vann	-	2
x 2 PCR buffer	x 2	5
Forward primer	10µM	0,5
Rewers primer	10µM	0,5
templat	cDNA	2

3.11 Bioinformatiske verktøy

DNA/ aminosyresekvenser ble sammenliknet mot predikerte sekvenser i GenBank ved hjelp av «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST) tilgjengelig ved :

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Primere ble designet ved hjelp av «NCBI, Primer-BLAST», tilgjengelig ved :

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Forward og Reverse sekvenser ble satt sammen ved hjelp av programvaren «DNA star», tilgjengelig ved: (<https://www.dnastar.com/software/>).

DNA-sekvenser ble translatert til aminosyrer ved hjelp av programvare «ExPASy- Translate tool» tilgjengelig ved: (<https://www.expasy.org/>).

Sekvenser ble alignet ved hjelp av programvaren «Multiple Sequence Alignment – Clustal Omega», tilgjengelig ved: (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) og « Pairwiser Sequence Alignment- EMBOSS Water», tilgjengelig ved:

(https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)

Fylogenetiske trær ble konstruert ved hjelp av programvaren «Molecular Evolutionary Genetic Analysis- MEGA X) , ved bruk av 1000 «bootstrap» replikater, tilgjengelig ved: (<https://www.megasoftware.net>).

Organisering av eksoner og introner ble studert ved hjelp av « Splign», tilgjengelig ved (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>).

Visualisering av introner og eksoner ble utført ved hjelp av programmet BioRender, tilgjengelig ved : (<https://app.biorender.com/illustrations/edit>).

N-glykosylerings seter ble predikert ved hjelp av «NetNGlyc 1.0 Server» tilgjengelig ved: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

O- glykosylerings seter ble predikert ved hjelp av « NetOGlyc 4.0 Server» tilgjengelig ved:

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)

Proteinstruktur av pIgRL ble predikert ved hjelp av «Simple Modular Architecture Research Tool- SMART», tilgjengelig ved: (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

Signalpeptid ble predikert ved hjelp av programvaren «SignalIP- 5.0 Server» tilgjengelig ved (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Transmembran-regioner ble predikert ved hjelp av programmet «Prediction of Transmembrane regions and Orientation- TMpred» tilgjengelig ved: (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)

Disulfidbindinger ble predikert med programvaren « Cystein state and Disulfid Bond partner prediction_ DiANNA 1.1» tilgjengelig ved: (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)

Visualisering av relativ mengde pIgRL i forskjellige vev ble gjort ved hjelp av programvaren «Prizm» , tilgjengelig ved: (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) .

Resultater (4)

4.1 Identifikasjon av berggylt pIgRL

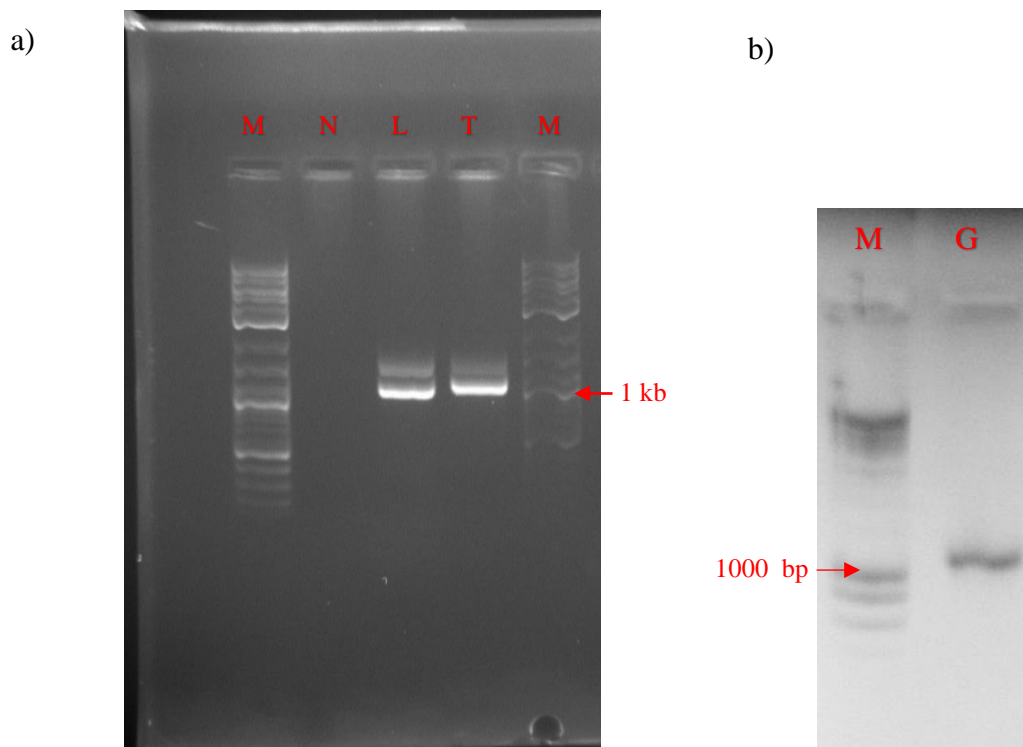
Da arbeidet med denne masteroppgaven begynte var første versjon av berggylt-genomet tilgjengelig i GenBank. I tillegg var transkriptom-data fra tarmvev (og automatisk predikerte transkripter) tilgjengelig i GenBank. Et pIgR-gen var identifisert og karakterisert av PhD-stipendiat Angela Etayo. Dette genet var lokalisert på Scaffold 492 i berggylt-genomet, og viste samme nabogener som hos andre teleoster, i tillegg til at den translaterte aminosyre-sekvensen var relativt lik de tilsvarende sekvensene i teleoster. Det hersket derfor ingen tvil om berggylt pIgR var det korresponderende genet som er publisert fra andre teleoster (manuskript under utarbeiding, personlig kommunikasjon, Ivar Hordvik).

Det har imidlertid vært delte meninger om hvorvidt pIgR hos fisk er en virkelig funksjonell homolog til pIgR hos pattedyr. For å undersøke om det kunne være andre liknende gener hos berggylt ble det innledningsvis gjort BLAST-søk i berggylt-genomet med pIgR-sekvenser fra henholdsvis mus, menneske, kylling og frosk (aminosyresekvens mot translert genom) i nært samarbeid med Ivar Hordvik. I alle tilfellene scoret Scaffold 539 høyere enn Scaffold 492. Genet som var årsaken til treffene med pIgR ble kalt for pIgRL. Etter å ha identifisert pIgRL-genet i Scaffold 539 ble et tilsvarende predikert transkript identifisert. På basis av dette, og ekson/intron-analyse av pIgRL, ble det designet primere for kloning og RT-qPCR-analyse.

4.2 Kloning og karakterisering av berggylt pIgRL cDNA

Vev som ble valgt for å gjennomføre kloning og sekvensering ble hentet fra berggylt som kom fra MOWI-anlegget i Øygarden. Det ble valgt et primerpar som amplifiserer mesteparten av den kodende regionen av pIgRL (primerparet pIgRL2 Forward og pIgRL5 Reverse). PCR-amplifikasjonen ble basert på cDNA fra baktarm, gjelle, lever og nyre. PCR-produktene ble innledningsvis analysert ved gelelektroforese. PCR-produktet fra nyre gav ingen bånd, mens PCR-produktene fra lever og baktarm gav klare bånd med forventet størrelse, men også flere bånd, noe som kunne indikere at det finnes flere spleisvarianter av genet Figur (4.1) a). PCR-produktet fra gjelle gav svake bånd Figur (4.1) b).

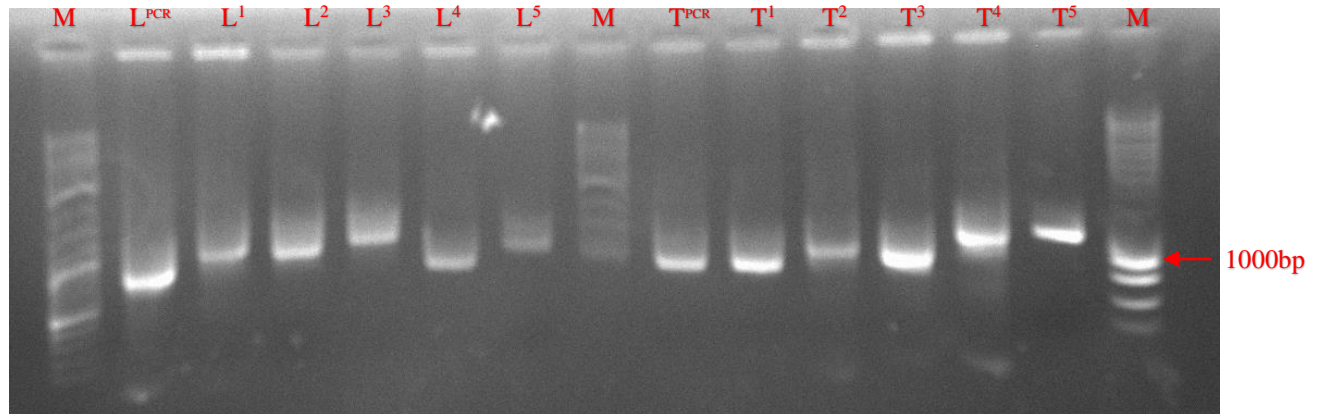
Figur (4.1)



Figur 4.1 Gelelektroforese av PCR-produkter med primer-kombinasjonen F2/R5. a) Brønner betegnet med M viser molekylvekt-standard. Brønn N inneholder PCR-produktet fra nyre (fisk Ø1), brønn L inneholder PCR-produktet fra lever (fisk Ø1), og brønn T inneholder PCR-produktet fra baktarm (fisk Ø-3). b) Brønner betegnet med M viser molekylvekt-standard. Brønneren betegnet med G viser PCR-produktet fra gjelle.

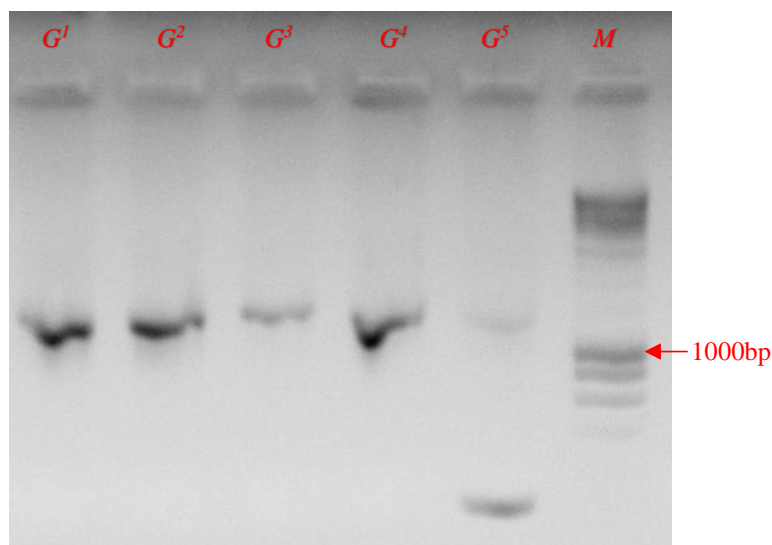
Kloning i plasmidvektor resulterte i mange kolonier, og 5 kloner fra lever, 5 kloner fra baktarm og 5 kloner fra gjelle ble screenet ved hjelp av PCR. Alle klonene fra lever, baktarm og gjelle viste innsatte DNA-fragmenter, men fragmentlengden på de forskjellige klonene varierte i størrelse Figur (4.2) og Figur (4.3). For å undersøke om det fantes flere spleisvarianter av pIgRL i berggylt ble alle klonene fra lever (L^1 - L^5) og baktarm (T^1 - T^5) sekvensert. En klon fra gjelle (G^1) ble valgt for sekvensering.

Figur (4.2)



Figur 4.2 Screening av plasmid-kloner fra lever og baktarm. Gelen viser amplifiserte kloner fra henholdsvis lever og baktarm. Brønner betegnet med M inneholder molekylvektstandard. Brønner betegnet med L inneholder kloner fra lever, brønner betegnet med T inneholder kloner fra baktarm. Brønn L^{PCR} inneholder PCR-produktet fra lever, brønn T^{PCR} inneholder PCR-produktet fra baktarm.

Figur (4.3)

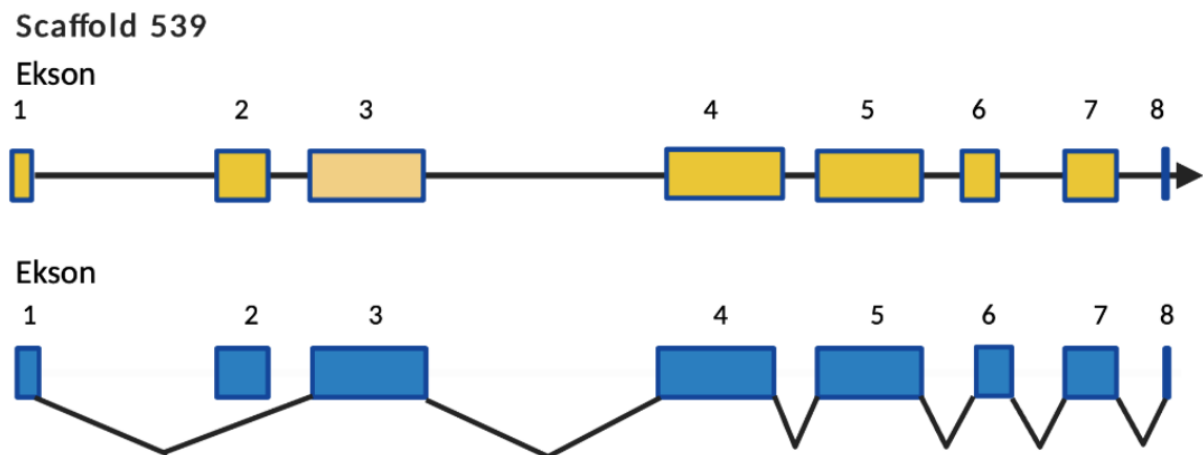


Figur 4.3 Screening av plasmid-kloner fra gjelle. Brønner betegnet med M inneholder molekylvektstandard. Brønner betegnet med G inneholder kloner fra gjelle.

Sekvensering av kloner fra lever gav fem sekvenser, heretter kalt L_k1, L_k2, L_k3, L_k4, L_k5 med lengde på henholdsvis 1172 bp, 1516 bp, 1429 bp, 1641 bp, og 1173 bp. Sekvensering av kloner fra baktarm gav fem sekvenser, heretter kalt T_k1, T_k2, T_k3, T_k4, T_k5 med lengde på henholdsvis 1173 bp, 1112 bp, 1374 bp, 1187 bp og 1172 bp. Den sekvenserte klonen fra gjelle, heretter kalt G_k1 hadde en lengde på 1173 bp.

For å analysere ekson/intron-organisering ble cDNA-sekvensene sammenstilt med genomsekvensen fra Scaffold 539 i berggyllt-genomet. Sekvenserte kloner viste seg å ha en dominerende variant representert av L_k1, L_k5, T_k1, T_k4 og G_k1, som illustrert i Figur (4.4).

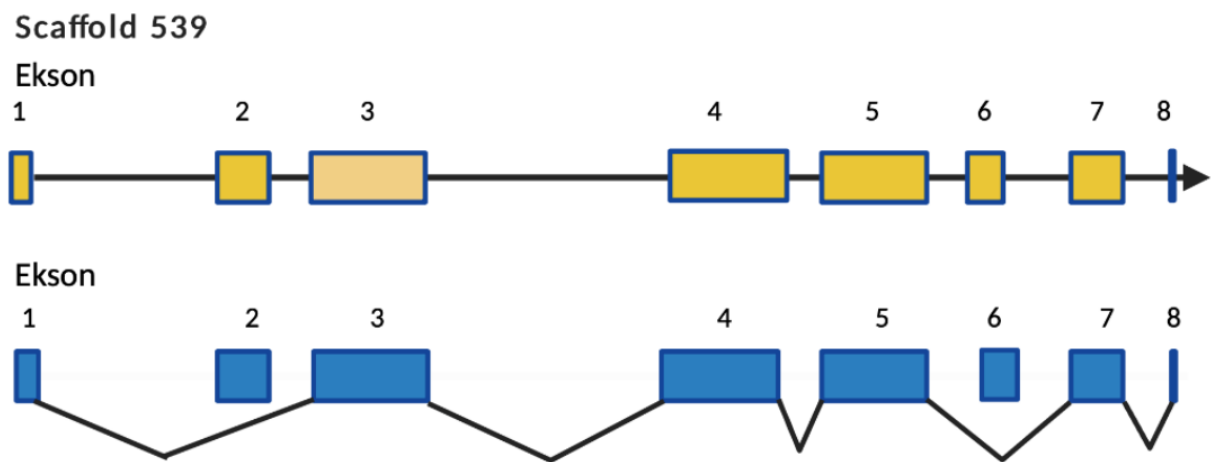
Figur (4.4)



Figur 4.4 Skjematisk illustrasjon av spleisvarianten representert ved klonene L_k1, L_k5, T_k1, T_k4 og G_k1. pIgRL-genet i Scaffold 539 er vist øverst (eksoner i gult) og spleisingen av eksonene under (i blått). Introner som er spleiset ut er vist som v-formede linjer.

Klonen T_k2 viste seg å samsvare med den predikerte sekvensen for pIgRL i GenBank (XM_020654174), som vist i Figur (4.5).

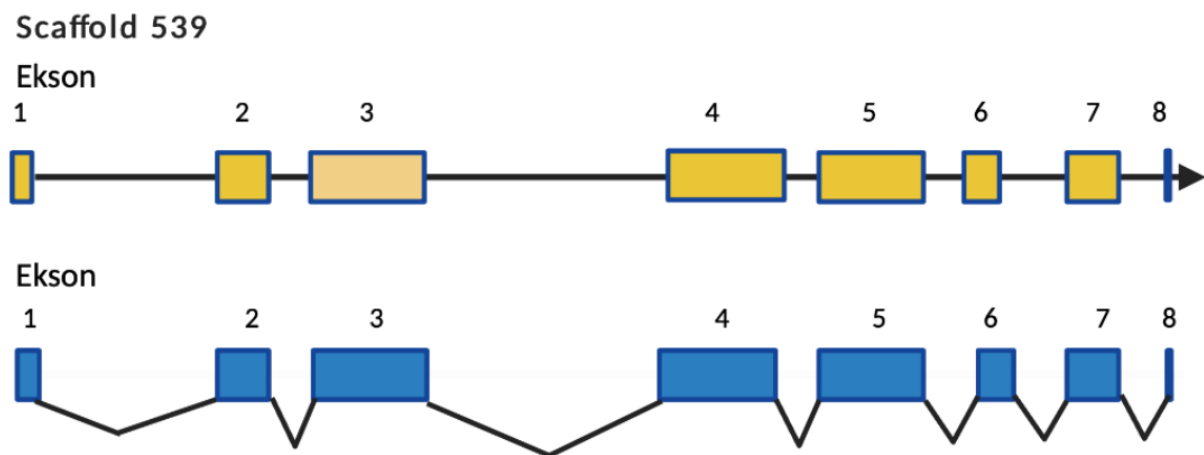
Figur (4.5)



Figur 4.5 Skjematisk illustrasjon av spleisvarianten representert ved klon T_k2. pIgRL-genet i Scaffold 539 er vist øverst (eksoner i gult) og spleisingen av eksonene under (i blått). Introner som er spleiset ut er vist som V-formede linjer.

En annen spleisvariant av pIgRL, der et ekstra ekson er til stede, var representert ved klon T_k3, som illustrert i Figur (4.6).

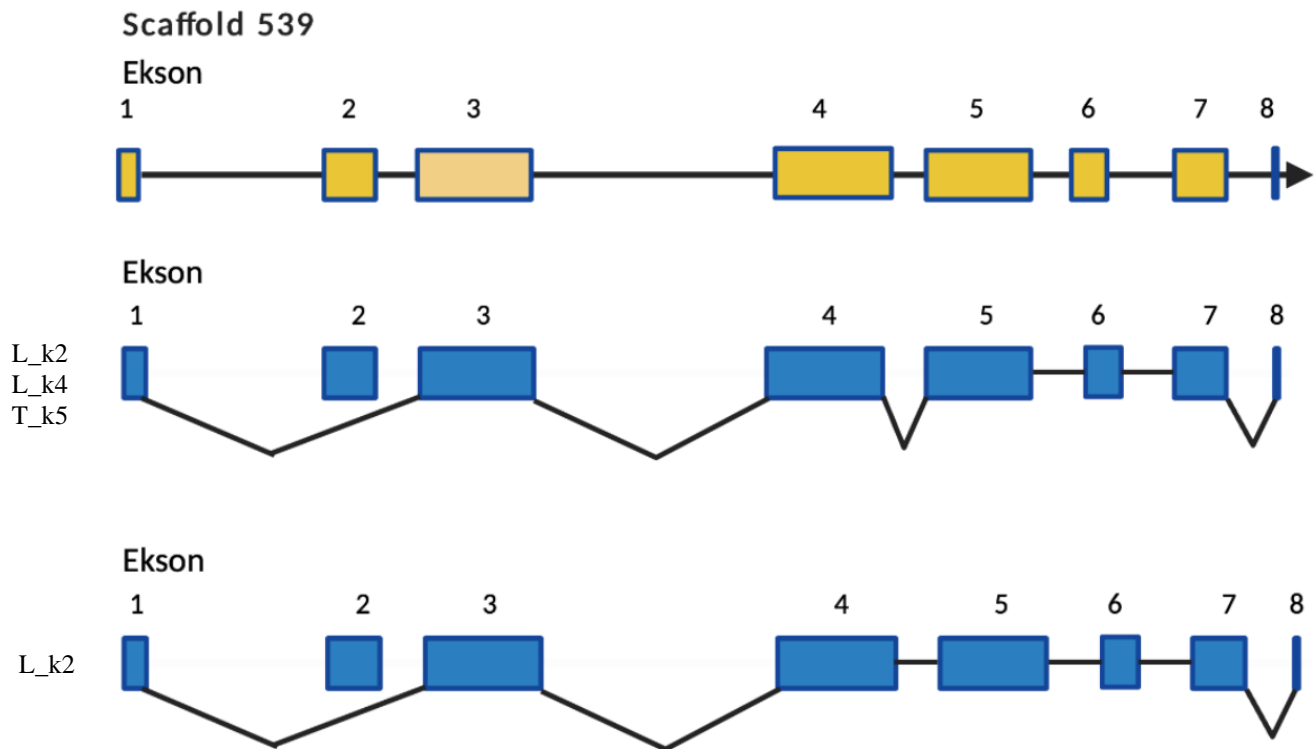
Figur (4.6)



Figur 4.6 Skjematisk illustrasjon av spleisvarianten representert ved klon T_k3. pIgRL-genet i Scaffold 539 er vist øverst (eksoner i gult) og spleisingen av eksonene under (i blått). Introner som er spleiset ut er vist som V-formede linjer.

Flere kloner viste seg å være pre-transkripter, der ulike kombinasjoner av introner var intakt, representert ved klonene L_k2, L_k3, L_k4, L_k5, som vist i Figur (4.7).

Figur (4.7)



Figur 4.7 Skjematisk illustrasjon av pre-transkripter representert ved klonene L_k2, L_k3, L_k4 og T_k5. pIgRL-genet i Scaffold 539 er vist øverst (eksoner i gult) og spleisingen av eksonene under (i blått). Introner som er spleiset ut er vist som v-formede linjer, mens rette streker indikerer intakte introner.

Primere for amplifisering av pIgRL cDNA ble designet med utgangspunkt i den predikerte sekvensen (XM_020654174) og begrenser seg til en del av den kodende regionen. Forward-primeren (pIgRL F2) inkluderer start-kodonet ATG i posisjon fem. Reverse-primeren (pIgRL R5) er lokalisert like nedenfor transmembranpeptidet i den translaterte regionen og går over en ekson/ekson-grense. Nukleotidsekvensene til de forskjellige spleisvariantene som ble identifisert i dette studiet er vist i Figur (4.8 – 4.10). Enkelte nukleotid-substitusjoner indikerer at de transkriberte produktene kommer fra to ulike allel-varianter av samme gen, mens andre er sannsynlige PCR-mutasjoner.

Den dominerende varianten representert av L_k1, L_k5, T_k1, T_k4 og G_k1 er vist i Figur (4.8), mens Figur (4.9) viser klonen BT_2 som samsvarer med den predikerte varianten av pIgRL (XM_020654174). Figur (4.10) viser klon T_k3, som er en tredje spleisvariant av pIgRL-genet.

Figur (4.8)

			pIgRL F2	
XM_020654174	ttcacagaaacccttcatttctgtttctgtttccttgcaagagcatgaagatgttgagc	60		
G_k1	-----GAGCATGAAGATGTTGANN	19		
T_k4	-----GAGCATGAAGATGTTGAGC	19		
L_k5	-----GAGCATGAAGATGTTGAGC	19		
L_k1	-----GAGCATGAAGATGTTGAGC	19		
T_k1	-----GAGCATGAAGATGTTGAGC	19		

XM_020654174	cggatgttcacctgtgtattgctctgagtggtgtcagcaattcagcagcgctgatcact	120		
G_k1	CGGATGTTTCATCCTGTGTATTGCTCTGAGTGGTGTCTGAGCAATTCAGCAGCGCTGATCACT	79		
T_k4	CGGATGTTTCATCCTGTGTATTGCTCTGAGTGGTGTCTGAGCAATTCAGCAGCGCTGATCACT	79		
L_k5	CGGATGTTTCATCCTGTGTATTGCTCTGAGTGGTGTCTGAGCAATTCAGCAGCGCTGATCACT	79		
L_k1	CGGATGTTTCATCCTGTGTATTGCTCTGAGTGGTGTCTGAGCAATTCAGCAGCGCTGATCACT	79		
T_k1	CGGATGTTTCATCCTGTGTATTGCTCTGAGTGGTGTCTGAGCAATTCAGCAGCGCTGATCACT	79		

XM_020654174	gtgtctggatatgaaggaagcagtggtgtatctctgttcttatggcatgggttatgac	180		
G_k1	GTGTCTGGATATGAAGGAAAAGCAGTGGGTATCTCTGTTCTTATGGCATGGGTATGAC	139		
T_k4	GTGTCTGGATATGAAGGAAAAGCAGTGGGTATCTCTGTTCTTATGGCATGGGTATGAC	139		
L_k5	GTGTCTGGATATGAAGGAAAAGCAGTGGGTATCTCTGTTCTTATGGCATGGGTATGAC	139		
L_k1	GTGTCTGGATATGAAGGAAAAGCAGTGGGTATCTCTGTTCTTATGGCATGGGTATGAC	139		
T_k1	GTGTCTGGATATGAAGGAAAAGCAGTGGGTATCTCTGTTCTTATGGCATGGGTATGAC	139		

XM_020654174	tcttatgagaagtacctgtgcaggaatgactgcggtagcaatgatgttcttgaacgacg	240		
G_k1	TCTTATGAGAAGTACCTGTGCAGGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTTCTTGTAAACGACG	199		
T_k4	TCTTATGAGAAGTACCTGTGCAGGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTTCTTGTAAACGACG	199		
L_k5	TCTTATGAGAAGTACCTGTGCAGGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTTCTTGTAAACGACG	199		
L_k1	TCTTATGAGAAGTACCTGTGCAGGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTTCTTGTAAACGACG	199		
T_k1	TCTTATGAGAAGTACCTGTGCAGGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTTCTTGTAAACGACG	199		

XM_020654174	acagaacaagtaaaaacagattctccatctacgatgacaaagagaaacgagtcttcaca	300		
G_k1	ACAGAAACAAGTAAAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAAGAGAAACGAGTCTTCACA	259		
T_k4	ACAGAAACAAGTAAAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAAGAGAAACGAGTCTTCACA	259		
L_k5	ACAGAAACAAGTAAAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAAGAGAAACGAGTCTTCACA	259		
L_k1	ACAGAAACAAGTAAAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAAGAGAAACGAGTCTTCACA	259		
T_k1	ACAGAAACAAGTAAAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAAGAGAAACGAGTCTTCACA	259		

XM_020654174	gccagattactggtctcacactaacggatgctgggaagtactggtgtgggtgacc-ag	359		
G_k1	GCCAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGTGACCCAG	319		

T_k4	GCCAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGGTGACC-AG	318
L_k5	GCCAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGGTGACC-AG	318
L_k1	GCCAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGGTGACC-AG	318
T_k1	GCCAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGGTGACC-AG	318

XM_020654174	gaatgggaaagatatctacactgaagtaaagctgctagtcggaaaagacagctgctgtga	419
G_k1	GAATGGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGAAGACAGCTGCTGTGA	379
T_k4	GAATGGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGAAGACAGCTGCTGTGA	378
L_k5	GAATAGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGAAGACAGCTGCTGTGA	378
L_k1	GAATGGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGAAGACAGCTGCTGTGA	378
T_k1	GAATGGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGAAGACAGCTGCTGTGA	378

XM_020654174	tcaatctaccagactacaaagtatatgaggacggctcagtggaacttgattgcccgtacaa	479
G_k1	TCAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGGCTCAGTGGACTTGATTGCCCCGTACAA	439
T_k4	TCAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGGCTCAGTGGACTTGATTGCCCCGTACAA	438
L_k5	TCAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGGCTCAGTGGACTTGATTGCCCCGTACAA	438
L_k1	TCAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGGCTCAGTGGACTTGATTGCCCCGTACAA	438
T_k1	TCAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGGCTCAGTGGACTTGATTGCCCCGTACAA	438

XM_020654174	gcagaaggaccaagacaacctgaagtacatctgcagaggaaccagtcctccacatgtct	539
G_k1	GCAGAAGGACCAAGACAACCTGAAGTACATCTGCAGAGGAAACCAGTCCTCCACATGTCT	499
T_k4	GCAGAAGGACCAAGACAACCTGAAGTACATCTGCAGAGGAAACCAGTCCTCCACATGTCT	498
L_k5	GCAGAAGGACCAAGACAACCTGAAGTACATCTGCAGAGGAAACCAGTCCTCCACATGTCT	498
L_k1	GCAGAAGGACCAAGACAACCTGAAGTACATCTGCAGAGGAAACCAGTCCTCCACATGTCT	498
T_k1	GCAGAAGGACCAAGACAACCTGAAGTACATCTGCAGAGGAAACCAGTCCTCCACATGTCT	498

XM_020654174	gcagcaggcactgggtcacatctgagtacaaacaaaagggatacttcagtctggctgataa	599
G_k1	GCAGCAGGCACTGGTCACATCTGAGTACAAACAAAAGGGATACTTCAGTCTGGCTGATAA	559
T_k4	GCAGCAGGCACTGGTCACATCTGAGTACAAACAAAAGGGATACTTCAGTCTGGCTGATAA	558
L_k5	GCAGCAGGCACTGGTCACATCTGAGTACAAACAAAAGGGATACTTCAGTCTGGCTGATAA	558
L_k1	GCAGCAGGCACTGGTCACATCTGAGTACAAACAAAAGGGATACTTCAGTCTGGCTGATAA	558
T_k1	GCAGCAGGCACTGGTCACATCTGAGTACAAACAAAAGGGATACTTCAGTCTGGCTGATAA	558

XM_020654174	caagatgtcaatgaaattcacagtgaccatcaccagtttgacccggaaggattctgggcc	659
G_k1	CAAGATGTCAATGAAATTACAGTGACCATCACCAGTTTGACCCGGAAGGATTCTGGGCC	619
T_k4	CAAGATGTCAATGAAATTACAGTGACCATCACCAGTTTGACCCGGAAGGATTCTGGGCC	618
L_k5	CAAGATGTCAATGAAATTACAGTGACCATCACCAGTTTGACCCGGAAGGATTCTGGGCC	618
L_k1	CAAGATGTCAATGAAATTACAGTGACCATCACCAGTTTGACCCGGAAGGATTCTGGGCC	618
T_k1	CAAGATGTCAATGAAATTACAGTGACCATCACCAGTTTGACCCGGAAGGATTCTGGGCC	618

XM_020654174	gtacctctgtggtgtccaaagaaagtcgacctggatgttttactgctgttagtctgga	719
G_k1	GTACCTCTGTGGTGTCCTCAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTCACTGCTGTAGTCTGGA	679
T_k4	GTACCTCTGTGGTGTCCTCAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTCACTGCTGTAGTCTGGA	678
L_k5	GTACCTCTGTGGTGTCCTCAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTCACTGCTGTAGTCTGGA	678
L_k1	GTACCTCTGTGGTGTCCTCAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTCACTGCTGTAGTCTGGA	678
T_k1	GTACCTCTGTGGTGTCCTCAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTCACTGCTGTAGTCTGGA	678

XM_020654174	agtcaatgagtggtgctgtgtgtggagtcaagtgaactgagcggcattgtggggcatcctct	779
G_k1	AGTCAATGAGTGGTGCTGTGTGGAGTCAAGTGAAGTGAAGCAGGATTGTGGGGCATCCTCT	739
T_k4	AGTCAATGAGTGGTGCTGTGTGGAGTCAAGTGAAGTGAAGCAGGATTGTGGGGCATCCTCT	738
L_k5	AGTCAATGAGTGGTGCTGTGTGGAGTCAAGTGAAGTGAAGCAGGATTGTGGGGCATCCTCT	738
L_k1	AGTCAATGAGTGGTGCTGTGTGGAGTCAAGTGAAGTGAAGCAGGATTGTGGGGCATCCTCT	738
T_k1	AGTCAATGAGTGGTGCTGTGTGGAGTCAAGTGAAGTGAAGCAGGATTGTGGGGCATCCTCT	738

XM_020654174	ttctatacagtggtccctaccacacctcaacactgggataacagaaagttcctttgcaaagg	839
G_k1	TTCTATACAGTGTCCCTACCCACCTCAACACTGGGATAACAGAAAGTTCTTTGCAAAGG	799
T_k4	TTCTATACAGTGTCCCTACCCACCTCAACACTGGGATAACAGAAAGTTCTTTGCAAAGG	798
L_k5	TTCTATACAGTGTCCCTACCCACCTCAACACTGGGATAACAGAAAGTTCTTTGCAAAGG	798
L_k1	TTCTATACAGTGTCCCTACCCACCTCAACACTGGGATAACAGAAAGTTCTTTGCAAAGG	798
T_k1	TTCTATACAGTGTCCCTACCCACCTCAACACTGGGATAACAGAAAGTTCTTTGCAAAGG	798

XM_020654174	agaccaccgcaaaaactgcacagatgtaagtactcagagcaggttctcattacaagataa	899
G_k1	AGACCACCGCAAAAAGTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAA	859
T_k4	AGACCACCGCAAAAAGTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAA	858
L_k5	AGACCACCGCAAAAAGTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAA	858
L_k1	AGACCACCGCAAAAAGTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAA	858
T_k1	AGACCACCGCAAAAAGTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAA	858

XM_020654174	tgttttcttcaagctcttttctcggtgatgatcacaagaaccaaagtagaggatgccggggac	959
G_k1	TGTTTCTTCAAGCTCTTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAGTAGAGGATGCCGGGGAC	919
T_k4	TGTTTCTTCAAGCTCTTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAGTAGAGGATGCCGGGGAC	918
L_k5	TGTTTCTTCAAGCTCTTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAGTAGAGGATGCCGGGGAC	918
L_k1	TGTTTCTTCAAGCTCTTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAGTAGAGGATGCCGGGGAC	918
T_k1	TGTTTCTTCAAGCTCTTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAGTAGAGGATGCCGGGGAC	918

XM_020654174	atactggtgtggttcagactcacagtgggcagtgaggaaacttcaccaagattcatctgtc	1019
G_k1	ATACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGCAGTGGGAACTTCACCAAGATTCATCTGTCTC	979
BT_k4	ATACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGCAGTGGGAACTTCACCAAGATTCATCTGTCTC	978
L_k5	ATACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGCAGTGGGAACTTCACCAAGATTCATCTGTCTC	978
L_k1	ATACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGCAGTGGGAACTTCACCAAGATTCATCTGTCTC	978
BT_k1	ATACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGCAGTGGGAACTTCACCAAGATTCATCTGTCTC	978

XM_020654174	attagat-----	1026
G_k1	ATTAGACTTTTCACAGCAGACCAGTGACCA-----GAAAACAACGTCAT	1024
T_k4	ATTAGACTTTTCACAGCAGACCAGTGCTGAATCCTGTGGATCAAAAACAACGTTTAT	1038
L_k5	ATTAGACTTTTCACAGCAGACCAGTGACCA-----GAAAACAACGTCAT	1023
L_k1	ATTAGACTTTTCACAGCAGACCAGTGACCA-----GAAAACAACGTCAT	1023
T_k1	ATTAGACTTTTCACAGCAGACCAGTGACCA-----GAAAACAACGTCAT	1023

XM_020654174	-----gcagaacacttcctctctgtgggtgtcatgttgccac	1064
G_k1	CCCTGACAGAAATGTCAAAGATGCAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGTCATGTTGCCAC	1084
T_k4	CCCTGACAGAAATGTCAAAGATGCAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGTCATGTTGCCAC	1098
L_k5	CCCTGACAGAAATGTCAAAGATGCAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGTCATGTTGCCAC	1083
L_k1	CCCTGACAGAAATGTCAAAGATGCAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGTCATGTTGCCAC	1083
T_k1	CCCTGACAGAAATGTCAAAGATGCAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGTCATGTTGCCAC	1083

XM_020654174	tgtgggtgccatcgctcctagtcatactgatcatttccgtggtcataatctataaatataa	1124
G_k1	TGTGGGTGCCATCGTCTCTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAAAATATAA	1144
T_k4	TGTGGGTGCCATCGTCTCTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAAAATATAA	1158
L_k5	TGTGGGTGCCATCGTCTCTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAAAATATAA	1143
L_k1	TGTGGGTGCCATCGTCTCTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAAAATATAA	1143
T_k1	TGTGGGTGCCATCGTCTCTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAAAATATAA	1143

	pIgRL R5	
XM_020654174	gtgtcgca gagcacaaggaaccaa aatccaaagagaagaggaaccaaaccaaagtgccagg	1184
G_k1	GTGTCGCAGAGCACAAAGGANNCAAAATNC-----	1173
T_k4	GTGTCGCAGAGCACAAAGGAACCAAAATCC-----	1187
L_k5	GTGTCGCAGAGCACAAAGGAACCAAAATCC-----	1172
L_k1	GTGTCGCAGAGCACAAAGGAACCAAAATCC-----	1172
T_k1	GTGTCGCAGAGCACAAAGGAACCAAAATCC-----	1172
	***** *	

Figur 4.8 Nukleotidsekvenser av den dominerende pIgRL mRNA-varianten i dette studiet, representert av L_k1, L_k5, T_k1, T_k4, G_k1, sammenlignet med den predikerte sekvensen av pIgRL i GenBank (XM_020654174). Forward primeren (pIgRL F2) er markert med gult. Reverse primeren (pIgRL R5) er markert med grønt. Start-kodonet er markert med blått. Identiske nukleotider er betegnet med (*), forskjell i nukleotider markert med rødt. (-) betegner insersjon/ delesjon. (N) betegner usikkert nukleotid.

Figur (4.9)

		pIgRL F2	
XM_020654174	ttcacagaaacccttcatttctgtttctgtttccttgcaa	gagcatgaagatgttgagc	60
T_k2	-----GAGCATGAAGATGTTGANN		19

XM_020654174	cggatgttcacctgtgtattgctctgagtggtgtcagcaattcagcagcgctgatcact		120
T_k2	CNNATGTTTCATCCTGTGTATGCTCTGAGTGGTGTGAGCAATTCAGCAGCGCTGATCACT		79
	* *****		
XM_020654174	gtgtctggatatgaaggaaaagcagtggggtatctcttggttcctatggcatgggttatgac		180
T_k2	GTGTCGGATATGAAGGAAAGCAGTGGGTATCTCTGTTCTTATGGCATGGGTATGAC		139

XM_020654174	tcttatgagaagtacctgtgcaggaatgactgcggtagcaatgatgttcttgaacgacg		240
T_k2	TCTTATGAGAAGTACCTGTGCAGGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTCTTGTAAACGACG		199

XM_020654174	acagaacaagtaaaacagattctccatctacgatgacaagagaaacgagctcttcaca		300
T_k2	ACAGAAACAAGTAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAGAGAAACGAGTCTTCACA		259

XM_020654174	gccagtattactgggtctcacactaacggatgctgggaagtactgggtggggtgaccagg		360
T_k2	GCCAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGGTGACCAGG		319

XM_020654174	aatgggaaagatatctacactgaagtaaagctgctagtcggaaaagacagctgctgtgat		420
T_k2	AATGGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGAAAAGACAGCTGCTGTGAT		379

XM_020654174	caatctaccagactacaaagttatgaggacggctcagtggaacttgatttgcccgtaacag		480
T_k2	CAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGGCTCAGTGGACTTGATTTGCCCGTACAAG		439

XM_020654174	cagaaggaccaagacaacctgaagtacatctgcagaggaaaccagtcctccacatgtctg		540
T_k2	CAGAAGGACCAAGACAACCTGAAGTACATCTGCAGAGGAAACCAGTCCTCCACATGTCTG		499

XM_020654174	cagcaggcactgggtcacatctgagtacaaacaaaaggatacttcagtcctggctgataac		600
T_k2	CAGCAGGCACTGGTCACATCTGAGTACAAACAAAAGGATACTTCAGTCTGGCTGATAAC		559

XM_020654174	aagatgtcaatgaaattcacagtgaccatcaccagtttgacccggaaggattctgggccg		660
T_k2	AAGATGTCAATGAAATTCACAGTGACCATACCAGTTTGACCCGGAAGGATTCTGGGCCG		619

XM_020654174	tacctctgtggtgtccaaagaagtcggacctggatgttttctactgctgttagtctggaa		720
T_k2	TACCTCTGTGGTGTCCAAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTCTACTGCTGTAGTCTGGAA		679

XM_020654174	gtcaatgagtggtgctgtgtggagtcaagtgaactgagcggcattgtggggcatcctctt		780
T_k2	GTCAATGAGTGGTGTGTGTGGAGTCAAGTGAAGTGAAGTGGGATGTTGGGGCATCCTCTT		739

XM_020654174	tctatacagtgtccctacccacctcaacactgggataacagaaagttcctttgcaaagga		840
T_k2	TCTATACAGTGTCCCTACCCACCTCAACACTGGGATAACAGAAAGTTCCTTTGCAAAGGA		799

XM_020654174	gaccaccgcaaaaactgcacagatgtaatgactcagagcaggttctcattacaagataat		900
T_k2	GACCACCGCAAAAACCTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAAT		859

XM_020654174	gtttcttcaagctctttctcggtgatgatcacaagaaccaaagtagaggatgccgggaca		960
T_k2	GTTTCTTCAAGCTCTTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAAAGTAGAGGATGCCGGGACA		919

XM_020654174	tactggtgtggttcagactcacagtgggcagtgggaaacttcaccaagattcatctgtca		1020
T_k2	TACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGAGTGGGAACTTCACCAAGATTCTCTGTCA		979

XM_020654174	ttagatgcagaacacttcctctctgtgggtgcatgttgcccactgtgggtgccatcgtc		1080
T_k2	TTAGATGCAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGTCATGTTGCCCACTGTGGGTGCCATCGTC		1039

		pIgRL R5	
XM_020654174	ctagtcatactgatcatttccgtggtcataatctataaatataagtgtcgcagagcaca		1140
T_k2	CTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAAATATAAGTGTGCGAGGCACAA		1099

```

*****
XM_020654174      ggaacccaaatccaaagagaagaggaacccaaacaaagtggcaggagtggaggaagtgatc      1200
T_k2              GGAACCAAAATCC-----                        1112
*****

```

Figur 4.9 Nukleotidsekvensen av klon T_k2 sammenlignet med den predikerte sekvensen av pIgRL (XM_020654174). Forward primeren (pIgRL F2) er markert med gult. Reverse primeren (pIgRL R5) er markert med grønt. Start-kodonet er markert i blått. Identiske nukleotider er betegnet med (*), forskjell i nukleotider markert med rødt. N betegner usikkert nukleotid.

Figur (4.10)

		pIgRL F2	
XM_020654174	42	gagcatgaagatg ttgagccg	gatgttcacacctgtgta----- 79
T_k3	1	GAGC ATG AAGATGTTGAGCCGATGTTTCATCCTGTGTATCTAAATTAGTA	50
XM_020654174	80	-----	79
T_k3	51	AATGAACAGGTCGCCAGATGGCCTAGAGGTTATGTCTAGCGCCCTATGTG	100
XM_020654174	80	-----	79
T_k3	101	CAGAGGTTATGGTCCTCGTCACAGCCGCCATGGGTTTGAATCCAACCTCG	150
XM_020654174	80	-----	79
T_k3	151	GCTGTTTGCTGCACGTCTTCCCCACTCGTTCCTTCCAACATTTCCTGTC	200
XM_020654174	80	-----ttgctctgagtggtgtcagcaat	102
T_k3	201	TCTCTTCAACTGTCCTATCCAATAAGGTGCTCTGAGTGGTGTGAGCAAT	250
XM_020654174	103	tcagcagcgctgatcactgtgtctggatatgaaggaaaagcagtggttat	152
T_k3	251	TCAGCAGCGCTGATCCTGTGTCTGGATATGAAGGAAAAGCAGTGGGTAT	300
XM_020654174	153	ctcttgctcctatggcattgggttatgactccttatgagaagtacctgtgca	202
T_k3	301	CTCTTGTTCTCTATGGCATGGGTATGACTCTTATGAGAAGTACCTGTGCA	350
XM_020654174	203	ggaatgactgcggttagcaatgatgttcttgtaacgacgacagaaacaagt	252
T_k3	351	GGAATGACTGCGGTAGCAATGATGTTCTGTAACGACGACAGAAACAAGT	400
XM_020654174	253	aaaaacagattctccatctacgatgacaaagagaaacgagtcttcacagc	302
T_k3	401	AAAAACAGATTCTCCATCTACGATGACAAAGAGAAACGAGTCTTCACAGC	450
XM_020654174	303	cagtattactggtctcacactaacggatgctgggaagtactggtgtgggg	352
T_k3	451	CAGTATTACTGGTCTCACACTAACGGATGCTGGGAAGTACTGGTGTGGGG	500
XM_020654174	353	tgaccaggaatgggaaagatatctacactgaagtaaagctgctagtcgga	402
T_k3	501	TGACCAGGAATGGGAAAGATATCTACACTGAAGTAAAGCTGCTAGTCGGA	550
XM_020654174	403	aaagacagctgctgtgatcaatctaccagactacaaagttatgaggacgg	452
T_k3	551	AAAGACAGCTGCTGTGATCAATCTACCAGACTACAAAGTTATGAGGACGG	600
XM_020654174	453	ctcagtggaacttgatttgcccgtaacagcagaaggaccaagacaacctga	502
T_k3	601	CTCAGTGGACTTGATTTGCCCGTACAAGCAGAAGGACCAAGACAACCTGA	650
XM_020654174	503	agtacatctgcagaggaaccagtcctccacatgtctgcagcaggcactg	552

T_k3	651	AGTACATCTGCAGAGGAAACAGTCTCTCCACATGTCTGCAGCAGGCACTG	700
XM_020654174	553	gtcacatctgagtacaacaaaaggatacttcagtcctggctgataacaa	602
T_k3	701	GTACATCTGAGTACAAACAAAAGGGATACTTCAGTCTGGCTGATAACAA	750
XM_020654174	603	gatgtcaatgaaattcacagtgaccatcaccagtttgacccggaaggatt	652
T_k3	751	GATGTCAATGAAATTACAGTGACCATCACCAGTTTGACCCGGAAGGATT	800
XM_020654174	653	ctgggcccgtacctctgtggtgtccaaagaaagtcgacctggatgttttc	702
T_k3	801	CTGGGCCGTACCTCTGTGGTGTCCAAAGAAAGTCCGACCTGGATGTTTTC	850
XM_020654174	703	actgctgttagtctggaagtcaatgagtggtgctgtgtggagtcaagtga	752
T_k3	851	ACTGCTGTTAGTCTGGAAGTCAATGAGTGGTGTCTGTGTGGAGTCAAGTGA	900
XM_020654174	753	actgagcggcattgtggggcatcctctttctatacagtgccctaccac	802
T_k3	901	ACTGAGCGGCATGTGTGGGCATCCTCTTCTATACAGTGCCCTACCCAC	950
XM_020654174	803	ctcaacactgggataacagaaagttcctttgcaaaggagaccaccgcaaa	852
T_k3	951	CTCAACACTGGGATGACAGAAAGTTCCCTTTGCAAAGGAGACCACCGCAA	1000
XM_020654174	853	aactgcacagatgtaatgactcagagcagggttctcattacaagataatgt	902
T_k3	1001	AACTGCACAGATGTAATGACTCAGAGCAGGTTCTCATTACAAGATAATGT	1050
XM_020654174	903	ttcttcaagctctttctcggtgatgatcacaagaaccaagtagaggatg	952
T_k3	1051	TTCTTCAAGCTCTTCTCGGTGATGATCACAAGAACCAGTAGAGGATG	1100
XM_020654174	953	ccgggacatactggtgtggttcagactcacagtgggcagtgaggaaacttc	1002
T_k3	1101	CCGGGACATACTGGTGTGGTTCAGACTCACAGTGGGCAGTGGGAACTTC	1150
XM_020654174	1003	accaagattcatctgtcatt-----	1022
T_k3	1151	ACCAAGATTCTCTGTCTTAGACTTTTCACAGCAGACCAGTGTGCTGAA	1200
XM_020654174	1023	-----agatg	1027
T_k3	1201	TCCTGTGGATCAAAAACAACGTTTATCCCTGACAGAAATGTCAAAGATG	1250
XM_020654174	1028	cagaacacttcctctctgtgggtgtcatgttgccactgtgggtgccatc	1077
T_k3	1251	CAGAACACTTCCTCTCTGTGGGTGCATGTTGCCACTGTGGGTGCCATC	1300
XM_020654174	1078	gtcctagtcatactgatcatttccgtgggcataatctataaatataagt	1127
T_k3	1301	GTCCTAGTCATACTGATCATTTCCGTGGTCATAATCTATAA--ATAAGTG	1348
		pIgRL R5	
XM_020654174	1128	tcgcagagcacaaggaacccaaatcc	1153
T_k3	1349	TCGCAGAGCACAAAGGAACCAAAATCC	1374

Figur 4.10 Nukleotidsekvensen av klon T_k3 mot den predikerte sekvensen av pIgRL (XM_020654174). Forward primeren (pIgRL F2) er markert med gult. Reverse primeren (pIgRL R5) er markert med grønt. Start-kodonet er markert i blått. Identiske nukleotider er betegnet med (*), forskjell i nukleotider markert med rødt. (-) betegner insersjon/ delesjon. (N) betegner usikkert nukleotid.

4.3 Analyse av translatert pIgRL mRNA

Analyse av det translaterte pIgRL-polypeptidet ble basert på den predikerte mRNA-sekvensen (XM_020654174) siden egne sekvenser manglet en del av cytoplasmatisk hale.

XM_020654174 koder for et polypeptid på 441 aminosyrer, med en molekylmasse på 49,34 kDa. Polypeptidet kan deles inn i et signal-peptid, 3 Ig-liknende domener (ILD), en «stilk» (hengselregion), en transmembrandel og en cytoplasmisk hale. Det mest påfallende med berggylt pIgRL er at den har 3 ILD i motsetning til 2 ILD i berggylt pIgR og publiserte pIgR- og pIgRL-sekvenser fra en rekke andre teleoster Figur (4.11) og (4.12).

Figur (4.11)

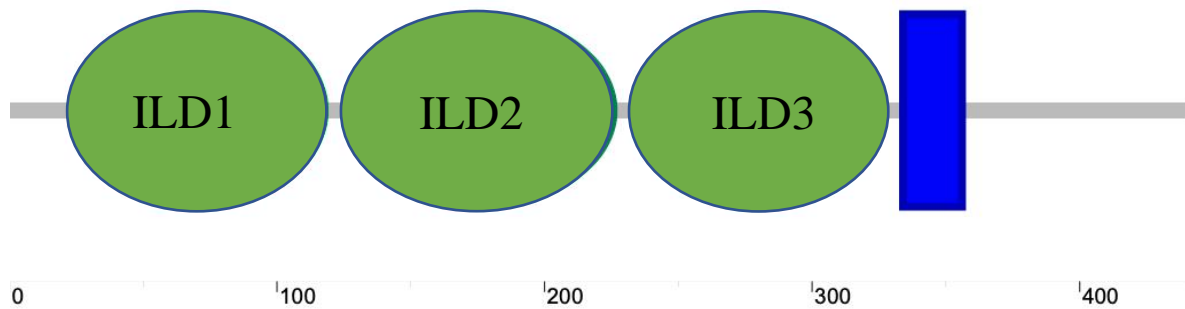
```

ttc aca gaa acc ctt cat ttc ttg ttt ctg ttt cct tgc aag agc atg aag atg ttg agc
F T E T L H F L F L F P C K S M K M L S
cgg atg ttc atc ctg tgt att gct ctg agt ggt gtc agc aat tca gca gcg ctg atc act
R M F I L C I A L S G V S N S A A L I T
gtg tct gga tat gaa gga aaa gca gtg ggt atc tct tgt tcc tat ggc atg ggt tat gac
V S G Y E G K A V G I S C S Y G M G Y D
tct tat gag aag tac ctg tgc agg aat gac tgc ggt agc aat gat gtt ctt gta acg acg
S Y E K Y L C R N D C G S N D V L V T T
aca gaa aca agt aaa aac aga ttc tcc atc tac gat gac aaa gag aaa cga gtc ttc aca
T E T S K N R F S I Y D D K E K R V F T
gcc agt att act ggt ctc aca cta acg gat gct ggg aag tac tgg tgt ggg gtg acc agg
A S I T G L T L T D A G K Y W C G V T R
aat ggg aaa gat atc tac act gaa gta aag ctg cta gtc gga aaa gac agc tgc tgt gat
N G K D I Y T E V K L L V G K D S C C D
caa tct acc aga cta caa agt tat gag gac ggc tca gtg gac ttg att tgc ccg tac aag
Q S T R L Q S Y E D G S V D L I C P Y K
cag aag gac caa gac aac ctg aag tac atc tgc aga gga aac cag tcc tcc aca tgt ctg
Q K D Q D N L K Y I C R G N Q S S T C L
cag cag gca ctg gtc aca tct gag tac aaa caa aag gga tac ttc agt ctg gct gat aac
Q Q A L V T S E Y K Q K G Y F S L A D N
aag atg tca atg aaa ttc aca gtg acc atc acc agt ttg acc cgg aag gat tct ggg ccg
K M S M K F T V T I T S L T R K D S G P
tac ctc tgt ggt gtc caa aga aag tcc gac ctg gat gtt ttc act gct gtt agt ctg gaa
Y L C G V Q R K S D L D V F T A V S L E
gtc aat gag tgg tgc tgt gtg gag tca agt gaa ctg agc ggc att gtg ggg cat cct ctt
V N E W C C V E S S E L S G I V G H P L
tct ata cag tgt ccc tac cca cct caa cac tgg gat aac aga aag ttc ctt tgc aaa gga
S I Q C P Y P Q H W D N R K F L C K G
gac cac cgc aaa aac tgc aca gat gta atg act cag agc agg ttc tca tta caa gat aat
D H R K N C T D V M T Q S R F S L Q D N
ggt tct tca agc tct ttc tcg gtg atg atc aca aga acc aaa gta gag gat gcc ggg aca
V S S S S F S V M I T R T K V E D A G T
tac tgg tgt ggt tca gac tca cag tgg gca gtg gga aac ttc acc aag att cat ctg tca
Y W C G S D S Q W A V G N F T K I H L S
tta gat gca gaa cac ttc ctc tct gtg ggt gtc atg ttg ccc act gtg ggt gcc atc gtc
L D A E H F L S V G V M L P T V G A I V
cta gtc ata ctg atc att tcc gtg gtc ata atc tat aaa tat aag tgt cgc aga gca caa
L V I L I I S V V I I Y K Y K C R R A Q
gga acc aaa atc caa gag aag agg aac caa acc aaa gtg gca gga gtg gag gaa gtg atc
G T K I Q E K R N Q T K V A G V E E V I
gat gtg gca gat att tat gaa aat caa ggc gct gca gct tgc tca aag cag gag acc tcc
D V A D I Y E N Q G A A A C S K Q E T S
aaa tgg cac agc tcc tgt cac cag aac gac aat gat gat gtg tac caa aac tgc tct aca
K W H S S C H Q N D N D D V Y Q N C S T
aca gaa gat atg tac tgt aac cag ttt tac ttg aag aca gcc aag aga tga gca gca tgg
T E D M Y C N Q F Y L K T A K R -
gaa tga att aac cga gtc cag aag ttg tat ata tct tgt ata tct tgt aat tat aaa tct
tggtgat aac cat ttc act aga aat acc tag ttg taa gtt aat atg tta aca tgt ggt agt
taa tgt tat gta tat gta tct cag acc ttt tct gtc atg cct ccc ctt gga aga gga ctc
ccc cac ccc cca gtt cac tat gaa gta ttg tgt gta aac aga gga atc agt tgc act ttc
ctt ttc tat att cac caa tca tat ctt ctt caa atg cta cca tta acc tat aga

```

Figur 4.11 Nukleotid og korresponderende aminosyresekvens til berggylt pIgRL (XM_020654174).
Signal-peptidet er farget i gult, ILD1, ILD2 og ILD3 er farget i grønt, og transmembran-regionen er farget i blått.

Figur (4.12)



Figur 4.12 Skjematisk illustrasjon av berggyt pIgRL protein-strukturen. ILD vist i grønt, transmembran-delen i blått.

Glykosylering sikrer korrekt folding av proteiner og er avgjørende for stabilitet og funksjon. N-glykosylering skjer ved å feste en karbohydratgruppe til akseptor-sekvensen Asn-Xaa-Ser/Thr (der Xaa kan være alle aminosyrer bortsett fra prolin).

Den predikerte sekvensen av pIgRL (XM_020654174) og klonene L_k1, L_k5, T_k1, T_k4 viste seg å ha fire mulige N-glykosyleringsseter i posisjonene 160, 271, 286, 319, vist i Figur (4.13). På grunn av rammeskift i klon G_k1 ble ikke denne tatt med i aminosyresekvens-alignmentet.

O-glykosylering skjer ved å feste en karbohydratgruppe til et oksygen-atom i enten serin eller threonin. Mulige O-glykosyleringsseter ble predikert ved hjelp av et bioinformatisk program som gir en sannsynlighetsscore fra 0,0 - 1,0. Kun verdier som overstiger 0,5 ble vurdert som potensielle glykosyleringsseter. Tabell (4.1), (4.2), (4.3), (4.4) og (4.5) viser aminosyreposisjoner for de predikerte O-glykosyleringsssetene med tilhørende sannsynlighetsverdier for alle de sekvenserte klonene av den dominerende varianten. Posisjonene til O-glykosyleringsssetene er vist i sekvens-alignmentet Figur (4.13). Det ble ikke funnet noen O-glykosyleringsseter med sannsynlighetsindeks over 0,5 for den predikerte sekvensen av pIgRL (XM_020654174).

Tabell 4.1 Sannsynlighetsverdier for O-glykosylerings seter i L_k1

Posisjon	Sannsynlighetsscore
338	0.565773
339	0.695647
340	0.7536869

Tabell 4.2 Sannsynlighetsverdier for O-glykosylerings seter i L_k5

Posisjon	Sannsynlighetsscore
330	0.521176
338	0.550801
339	0.671051
340	0.736067

Tabell 4.3 Sannsynlighetsverdier for O-glykosylerings seter i T_k1

Posisjon	Sannsynlighetsscore
330	0.5
338	0.541724
339	0.669206
340	0.745297

Tabell 4.4 Sannsynlighetsverdier for O-glykosylerings seter i T_k4

Posisjon	Sannsynlighetsscore
334	0.511352
341	0.812832
343	0.838056
344	0.908395
359	0.5467

Figur (4.13)

L.Bergylta_pIgRL	-MKMLSRMFILCIALSGVSNAAALITVSGYEGKAVGISC SYGMGYDSYEKYLCRNDCGSN	59
L_k1	SMKMLSRMFILCIALSGVSNAAALITVSGYEGKAVGISC SYGMGYDSYEKYLCRNDCGSN	60
L_k5	SMKMLSRMFILCIALSGVSNAAALITVSGYEGKAVGISC SYGMGYDSYEKYLCRNDCGSN	60
T_k1	SMKMLSRMFILCIALSGVSNAAALITVSGYEGKAVGISC SYGMGYDSYEKYLCRNDCGSN	60
T_k4	SMKMLSRMFILCIALSGVSNAAALITVSGYEGKAVGISC SYGMGYDSYEKYLCRNDCGSN	60

L.Bergylta_pIgRL	DVLVTTTETS KNRF SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWCGVTRNGKDIYEVKLLVG	119
L_k1	DVLVTTTETS KNRF SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWCGVTRNGKDIYEVKLLVG	120
L_k5	DVLVTTTETS KNRF SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWCGVTRNRKDIYEVKLLVG	120
T_k1	DVLVTTTETS KNRF SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWCGVTRNGKDIYEVKLLVG	120
T_k4	DVLVTTTETS KNRF SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWCGVTRNGKDIYEVKLLVG	120

L.Bergylta_pIgRL	KDSCCDQSTR LQSYEDGSVDLICPYKQKDQDNLKYICRG NQS STCLQQALVTSEYKQKGY	179
L_k1	KDSCCDQSTR LQSYEDGSVDLICPYKQKDQDNLKYICRG NQS STCLQQALVTSEYKQKGY	180
L_k5	KDSCCDQSTR LQSYEDGSVDLICPYKQKDQDNLKYICRG NQS STCLQQALVTSEYKQKGY	180
T_k1	KDSCCDQSTR LQSYEDGSVDLICPYKQKDQDNLKYICRG NQS STCLQQALVTSEYKQKGY	180
T_k4	KDSCCDQSTR LQSYEDGSVDLICPYKQKDQDNLKYICRG NQS STCLQQALVTSEYKQKGY	180

L.Bergylta_pIgRL	FSLADNKMSMKFTVTITSLTRKDSGPYLCGVQRKSDLDVFTAVSLEVNEWCCVESSELG	239
L_k1	FSLADNKMSMKFTVTITSLTRKDSGPYLCGVQRKSDLDVFTAVSLEVNEWCCVESSELG	240
L_k5	FSLADNKMSMKFTVTITSLTRKDSGPYLCGVQRKSDLDVFTAVSLEVNEWCCVESSELG	240
T_k1	FSLADNKMSMKFTVTITSLTRKDSGPYLCGVQRKSDLDVFTAVSLEVNEWCCVESSELG	240
T_k4	FSLADNKMSMKFTVTITSLTRKDSGPYLCGVQRKSDLDVFTAVSLEVNEWCCVESSELG	240

L.Bergylta_pIgRL	IVGHPLSIQCPYPPQHWDNRKFLCKGDHRK NCT DVMTQSRFSLQDN NV SSSFSVMITRTK	299
L_k1	IVGHPLSIQCPYPPQHWDNRKFLCKGDHRK NCT DVMTQSRFSLQDN NV SSSFSVMITRTK	300
L_k5	IVGHPLSIQCPYPPQHWDNRKFLCKGDHRK NCT DVMTQSRFSLQDN NV SSSFSVMITRTK	300
T_k1	IVGHPLSIQCPYPPQHWDNRKFLCKGDHRK NCT DVMTQSRFSLQDN NV SSSFSVMITRTK	300
T_k4	IVGHPLSIQCPYPPQHWDNRKFLCKGDHRK NCT DVMTQSRFSLQDN NV SSSFSVMITRTK	300

L.Bergylta_pIgRL	VEDAGTYWCGSDSQWAVG NFT KIHLSLDF-----AEHFL V	334
L_k1	VEDAGTYWCGSDSQWAVG NFT KIHLSLDF SQQT SD----QKT TTS IPDRNVKDAEHFL S	355
L_k5	VEDAGTYWCGSDSQWAVG NFT KIHLSLDF SQQT SD----QKT TTS IPDRNVKDAEHFL S	355
T_k1	VEDAGTYWCGSDSQWAVG NFT KIHLSLDF SQQT SD----QKT TTS IPDRNVKDAEHFL S	355
T_k4	VEDAGTYWCGSDSQWAVG NFT KIHLSLDF SQQT SVLN PVG SKTT FIPDRNVKDAEHFL S	360

L.Bergylta_pIgRL	GVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTKIQEKRNTKVAGVEEVIDVADIYENQ	394
L_k1	GVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTKI-----	390
L_k5	GVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTKI-----	390
T_k1	GVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTKI-----	390
T_k4	GVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTKI-----	395

Figur 4.13 Potensielle glykosylerings seter i de ulike berggylt pIgRL spleisvariantene. N-glykolyserings seter er vist i rødt/blått (Aspargin i rød farge, resterende glykosylerings sete i blått) mens O-glykosylerings seter er markert i grønt.

Den predikerte pIgRL-sekvensen i berggylt (XM_020654174) og den dominerende spleisvarianten blant de sekvenserte klonene ble sammenlignet med pIgRL-sekvenser fra andre teleoster som vist i Figur (4.14). Konserverte cysteiner er markert med gult. Cysteiner kan observeres i like posisjoner, første cystein (C¹¹) og femte cystein (C¹⁰¹) former disulfidbinding. DxGxYxC er et konservert peptid som finnes i D1, D4 og D5 i høyerestående

vertebrater (Hamuro et al., 2017). I berggylt er dette konserverte peptidet til stede i ILD1, i posisjon (95-101), vist i Figur (4.14), og dette peptidet er også til stede i D5 i andre arter, som beskrevet i laks i posisjon (98- 104) og japansk flyndre og pIgR i fugu (Tadiso et al 2011; Liu et al., 2019; Hamuro et al., 2017).

Figur (4.14)

		<ILD1						
L.bergylta_pIgRL	-----MKMLSRMFILCI	ALSGVSN	SAALITVSGYEGKAVGIS	SYGMGYDSY	47			
N.celidotus_pIgRL	-----MKMLSLQSLMLILCI	ALSFVTRTAQ	LI	ALGYEGHAVDIS	SYYPAGYESY	50		
S.lucioperca_pIgRL	-----MRWWRHQSLFLFTLCI	ALSCVRS	AAGLIHVSGYEGREVKVS	CTYGEGYESY	50			
C.lumpus_pIgRL	-----MRVWNLQNLALLALCI	---CV	RSAGLIRVSGYEGGEVQVS	CYPYSEGYESY	47			
S.aurata_pIgRL	MLPPQNNKYRMRMWSLQSL	LITL	CVALS	CVTRAAGLIRVSGYEGREVDVP	CYPYGGGYESY	60		
L_k1	-----SMKMLSRMFILCI	ALSGVSN	SAALITVSGYEGKAVGIS	SYGMGYDSY	48			
L_k5	-----SMKMLSRMFILCI	ALSGVSN	SAALITVSGYEGKAVGIS	SYGMGYDSY	48			
T_k1	-----SMKMLSRMFILCI	ALSGVSN	SAALITVSGYEGKAVGIS	SYGMGYDSY	48			
T_k4	-----SMKMLSRMFILCI	ALSGVSN	SAALITVSGYEGKAVGIS	SYGMGYDSY	48			
	. :: **:		* : * ** . **** * : * * **::**					
L.bergylta_pIgRL	EKYL	CRND	CGSNDVLVTTTETS	SKNRF	SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWC	GVTRNG	107	
N.celidotus_pIgRL	EKYL	CRDNC	DDNDVLIKTTP	GPKKNKYSITDDKQKRVFTTTISGLT	SNDA	GKYWC	GVTKTG	110
S.lucioperca_pIgRL	EKYL	CKND	CGSGDVLITTT	EAKKNRYSIHDDKQKRVFAATISDLRHT	DAGKYWC	GVTRTG	110	
C.lumpus_pIgRL	EKYL	CKKNC	GNDDVLIKTTE	PNKNKYSIHDDNQKRVFTATISDL	SRTDAGKYWC	GVTRNG	107	
S.aurata_pIgRL	VKYL	CKND	CADKDVVVT	DRAEKSKYSIRDNR	TSRVFTATVSQLSRADAGKYWC	VVEKNG	120	
L_k1	EKYL	CRND	CGSNDVLVTTTETS	SKNRF	SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWC	GVTRNG	108	
L_k5	EKYL	CRDNC	DDNDVLIKTTP	GPKKNRFSIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWC	GVTRNR	108		
T_k1	EKYL	CRND	CGSNDVLVTTTETS	SKNRF	SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWC	GVTRNG	108	
T_k4	EKYL	CRND	CGSNDVLVTTTETS	SKNRF	SIYDDKEKRVFTASITGLTLTDAGKYWC	GVTRNG	108	
	****:..* . **::.*		.*::** *.. ****::: * ****:*** * ..					
		>	<ILD2					
L.bergylta_pIgRL	KDIYTEVKLLVGKDS	CCDQ	STRLQSYEDGSVDLI	CPYKQKDQDNLKYICRGNQ	SSSTCLQQ	167		
N.celidotus_pIgRL	KDLFSEVKLEVGKDS	CCDQ	STQHQS	YEESSVSFS	CYPYEPKDQKNLKYICRGRQTSTCLQQ	170		
S.lucioperca_pIgRL	KDIYTEVMLEVGQDS	CCDHS	AKVQR	YEESSVSFS	CYPYSEYQNSLKYICRGNQPSVCLQH	170		
C.lumpus_pIgRL	KDIYTDVSLVGHDT	CCAQ	STKVQSYEESSVSIS	CQY	ESEDQ-NLKYVCRGNQSTCLQEK	166		
S.aurata_pIgRL	KDIYTEVKLEVEQDT	CCDQ	SIKVEDH	EATVSFDC	PYESGDQNNQKYFCRGNLRSTCLQQ	180		
L_k1	KDIYTEVKLLVGKDS	CCDQ	STRLQSYEDGSVDLI	CPYKQKDQDNLKYICRGNQ	SSSTCLQQ	168		
L_k5	KDIYTEVKLLVGKDS	CCDQ	STRLQSYEDGSVDLI	CPYKQKDQDNLKYICRGNQ	SSSTCLQQ	168		
T_k1	KDIYTEVKLLVGKDS	CCDQ	STRLQSYEDGSVDLI	CPYKQKDQDNLKYICRGNQ	SSSTCLQQ	168		
T_k4	KDIYTEVKLLVGKDS	CCDQ	STRLQSYEDGSVDLI	CPYKQKDQDNLKYICRGNQ	SSSTCLQQ	168		
	::: * * :*.*** * : : : : : : : : * * : * . ***.***. * .***:							
		>						
L.bergylta_pIgRL	ALVTSEYKQKGYFSLADN	KMSMKFTVTITSL	TRKDSGPYL	CGVQRKSDLDVFTAVS	LEVN	227		
N.celidotus_pIgRL	ALITSNNNQQRFNLT	DNKRSNEFTVSI	ASLILKDAGSYL	CGVQRNNNLDVFTAVD	LEVK	230		
S.lucioperca_pIgRL	ALISSDNKQKGQFTLT	DDMASRKF	FTLITITSL	TQNNSGSYL	CGVHRNTGLDVFSAFE	LEVK	230	
C.lumpus_pIgRL	AILTSDNKQTGQFRL	TDDKVS	KRFTVTITGL	TQNHAGSYL	CGVHGNTGLDVFSAFE	LEVK	226	
S.aurata_pIgRL	ALFTSTSQSGRFR	LQDDTRV	KAFKATI	INLTQADSGQYL	CGVHRNTGLDVFTAVD	LVQV	240	
L_k1	ALVTSEYKQKGYFSLADN	KMSMKFTVTITSL	TRKDSGPYL	CGVQRKSDLDVFTAVS	LEVN	228		
L_k5	ALVTSEYKQKGYFSLADN	KMSMKFTVTITSL	TRKDSGPYL	CGVQRKSDLDVFTAVS	LEVN	228		
T_k1	ALVTSEYKQKGYFSLADN	KMSMKFTVTITSL	TRKDSGPYL	CGVQRKSDLDVFTAVS	LEVN	228		
T_k4	ALVTSEYKQKGYFSLADN	KMSMKFTVTITSL	TRKDSGPYL	CGVQRKSDLDVFTAVS	LEVN	228		
	.:. : * * * * :		* . : * . * . : * ****: . . ****:*.***:					
		<ILD3						
L.bergylta_pIgRL	EWCC	VESSELSGIVGHPLSIQ	CPYPPQHWDNRKFL	CKGDHRKNC	TDVMT-QSRFSLQDNV	286		
N.celidotus_pIgRL	EWCC	VRSSQLSGTVGRPVTLQ	CLHPPQHRDNRKFL	CKGDQRATCT	DMMS-DSRFSLQENV	289		
S.lucioperca_pIgRL	EWCC	VMSHKL	SGIVGRPVMTQC	CPYPPQH	RNRKFLCKGDHRKNC	KDMMTSQSRFMLQDDV	290	
C.lumpus_pIgRL	EWCC	VRSSKLSGIVGRPVMTQC	CPYPPQH	GDNRKFLCKGDHRNNC	TDVMTRRSRFTLQDDV	286		
S.aurata_pIgRL	EWCC	VKSQELSGTVGGQVTMR	CPYPPQHS	NYRKYLCKGDHRKRC	RDMS-QSRFTTQDHL	299		
L_k1	EWCC	VESSELSGIVGHPLSIQ	CPYPPQHWDNRKFL	CKGDHRKNC	TDVMT-QSRFSLQGNV	287		
L_k5	EWCC	VESSELSGIVGHPLSIQ	CPYPPQHWDNRKFL	CKGDHRKNC	TDVMT-QSRFSLQDNV	287		
T_k1	EWCC	VESSELSGIVGHPLSIQ	CPYPPQHWDNRKFL	CKGDHRKNC	TDVMT-QSRFSLQDNV	287		
T_k4	EWCC	VESSELSGIVGHPLSIQ	CPYPPQHWDNRKFL	CKGDHRKNC	TDVMT-QSRFSLQDNV	287		
	***** * *** * :		: : : * : **** : * : : ****: * * * : : *** * . :					
		>						
L.bergylta_pIgRL	SSSSFS	VMITR	TKVEDAGTYW	CGSDSQWAVGNFTKI	HLSLD	-----	327	
N.celidotus_pIgRL	TSSFFL	VVR	EIKAE	DTGTW	CGSDPQWKVANYTKI	QLS-----	328	
S.lucioperca_pIgRL	TSSSFS	VTITEL	KAGDAGTYW	CGSDSQWSV	GNYTKIQLSLDF	QQTSTVMSTINVVPTFTM	350	
C.lumpus_pIgRL	SSSSFL	VII	TELEAGDAGTYW	CGSDSQWTV	GNYTRIQLSASHS	-----	329	
S.aurata_pIgRL	SSGFFS	VTIKALK	TS	DAGTYL	CVSDPLWRPANYTKI	QLSVDSHMPGSTMI	PP-----NTV	354
L_k1	SSSSFS	VMITR	TKVEDAGTYW	CGSDSQWAVGNFTKI	HLSLDFS	QQTS	D-----QK-----	337
L_k5	SSSSFS	VMITR	TKVEDAGTYW	CGSDSQWAVGNFTKI	HLSLDFS	QQTS	D-----QK-----	337

```

T_k1          SSSSFVSMITRTKVEDAGTYWCGSDSQWAVGNFTKIHLSDLFSQQTSD-----QK----- 337
T_k4          SSSSFVSMITRTKVEDAGTYWCGSDSQWAVGNFTKIHLSDLFSQQTSVLNVPVGSK----- 342
              :*. * * :   :. :**** * * *   *   .*:*:*:**
              <TM          >

L.bergylta_pIgRL  -----AEHFLSVGVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTK 368
N.celidotus_pIgRL -----VAHFLSVGVAVPTVGVFLLALTFSSVMICRYKCRKVKGAE 369
S.lucioerca_pIgRL VEPVR-SQATPIPGKEIKDAALFYSGFIVPA----VLLILTSALVTVYKYCY--KGAG 403
C.lumpus_pIgRL    -----NAVVFIVPA----VLLTLTFALVIVYKYRCNKVRGAG 362
S.aurata_pIgRL    EETAGSQSTLGIPGTPPKDAKNTHLVVFIVPAVL---LVLMLAVLVFICKFKCHKVQEAG 411
L_k1             -----TTSIPDRNVKDAEHFLSVGVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTK 389
L_k5             -----TTSIPDRNVKDAEHFLSVGVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTK 389
T_k1             -----TTSIPDRNVKDAEHFLSVGVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTK 389
T_k4             -----TTFIPDRNVKDAEHFLSVGVMLPTVGAIVLVILIISVVIYKYKCRRAQGTK 394
              * . :*:   * :   * : :*:   : :

L.bergylta_pIgRL  IQEKRNQTKVAGVEEVIDVADIYENQGAACSKQETSKWHSSCHQN-----DNDDVYQN 422
N.celidotus_pIgRL VSGKRNQTKKAEADEVISVADDYENSDVIVRSKQRTSRPLSPQHQN-----EDDSVYQN 423
S.lucioerca_pIgRL GNMKRNKTKTAETEIVIGVADIYQNQDV-AYSKQRTSKPQSACQHDDAGEAEQDSVYQN 462
C.lumpus_pIgRL    ANMNRNVIKATETEEVMAGADIYENQDK-ACSQQGTSKPKQSAGQHYDDVGDDQGESIYQN 421
S.aurata_pIgRL    VVDSGNKTKAVRAEKVIDVDIYANQDV-VCKTQGTSY----DHY---DDAGDESIVYQN 462
              . * * . .:*:   * * *.. . . * **   .:   :::***

L.bergylta_pIgRL  CSTEDMYCNQFYLKTAKR 441
N.celidotus_pIgRL FST-DEIYCNQMYAASKR- 440
S.lucioerca_pIgRL VTTADDIYCNQIFIKANRR 481
C.lumpus_pIgRL    FTTDDIYCNEMYNKANRR 440
S.aurata_pIgRL    --TADDVYCNQFFPMKAKR- 478
              * :*:***:   : :

```

Figur 4.14 Aminosyre-alignment av den predikerte pIgRL-sekvensen i berggylt (XM_020654174), den dominerende varianten blant de sekvenserte klonene (L_k1, L_k5, T_k1, T_k4) og liknende pIgRL-sekvenser fra andre teleoster: Spotty (*Notolabrus celidotus*, XM_034688120), Gjørs (*Sander lucioperca*, XM_031289048), Rognkjeks (*Cyclopetrus lumpus*, XM_034544241), Havkaruss (*Sparus aurata*, XM_030437348). Cysteiner er markert med gult. Konserverte områder er markert med grått. ILD i berggylt er vist med understrek: ILD 1 i posisjon (23- 119), ILD2 i posisjon (127- 227), og ILD3 i posisjon (234- 325), transmembran-regionen i posisjon (334- 356) er vist i blått med strek under.

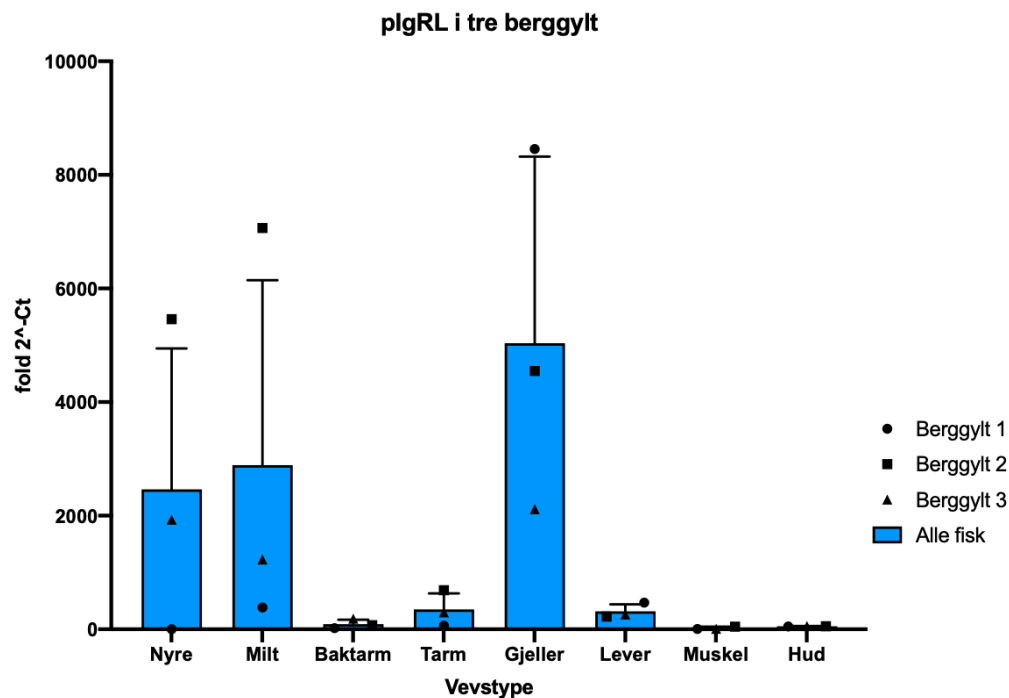
4.4 Estimering av relativ mengde pIgRL mRNA i forskjellige vev i berggylt

Uttrykking av pIgRL-genet i forskjellige vev i berggylt ble målt ved hjelp av RT-qPCR.

Vevsprøvene som ble brukt under denne studien kom fra frisk, oppdrettet berggylt fra MOWI sitt oppdrettsanlegg i Øygarden. For cDNA-syntese det ble brukt 200 ng av total-RNA per prøve og qPCR-målingene ble basert på SYBR® Green reagenser som beskrevet i avsnitt 3.10. For å teste effektiviteten til qPCR-assayene ble det laget standardkurver basert på fortynningsrekker av cDNA-templater. Fortynningsrekker på henholdsvis: ufortynnet, 1:10, 1:100, 1:1000, 1: 10 000, 1: 100 000 av cDNA fra milt og baktarm ble analysert. Tre assays ble testet: pIgRL-3, pIgRL-4 og pIgRL-5. Assayet pIgRL-3 viste den største effektiviteten. I påfølgende qPCR-oppsett ble det brukt 20 ng cDNA per prøve. Figur (4.15) viser uttrykkningsnivået til pIgRL i nyre, milt, baktarm, tarm, gjeller, lever, muskel og hud.

Uttrykkningsnivået til pIgRL var høyest i gjelle. Det var også relativt høyt i milt og nyre, mye høyere sammenliknet med de andre undersøkte vevene.

Figur (4.15)



Figur 4.15 Relativ mengde pIgRL mRNA i ulike vev hos berggylt. Åtte vevstyper fra organpakke tatt fra tre berggylter med samme opphav ble undersøkt. Gjennomsnittet av to RT- qPCR-verdier fra hver fisk, er illustrert ved bruk av relativ sammenligning mot minste registrerte genuttrykk. Prøver av gjeller har den høyeste konsentrasjonen av pIgRL (5038.5 ± 3284.6). Prøver fra nyre og milt viser ca halvparten så mye mRNA som registrert i gjellene (henholdsvis 2464.9 ± 2478.5 og 2891.8 ± 3254.1). Tarm (349.7 ± 281.8) og lever (318.4 ± 120.6) har noe utslag, mens i baktarm (92.5 ± 77.5), muskel (20.6 ± 25.3) og hud (53.4 ± 5.3) gav svært lave verdier.

Diskusjon (5)

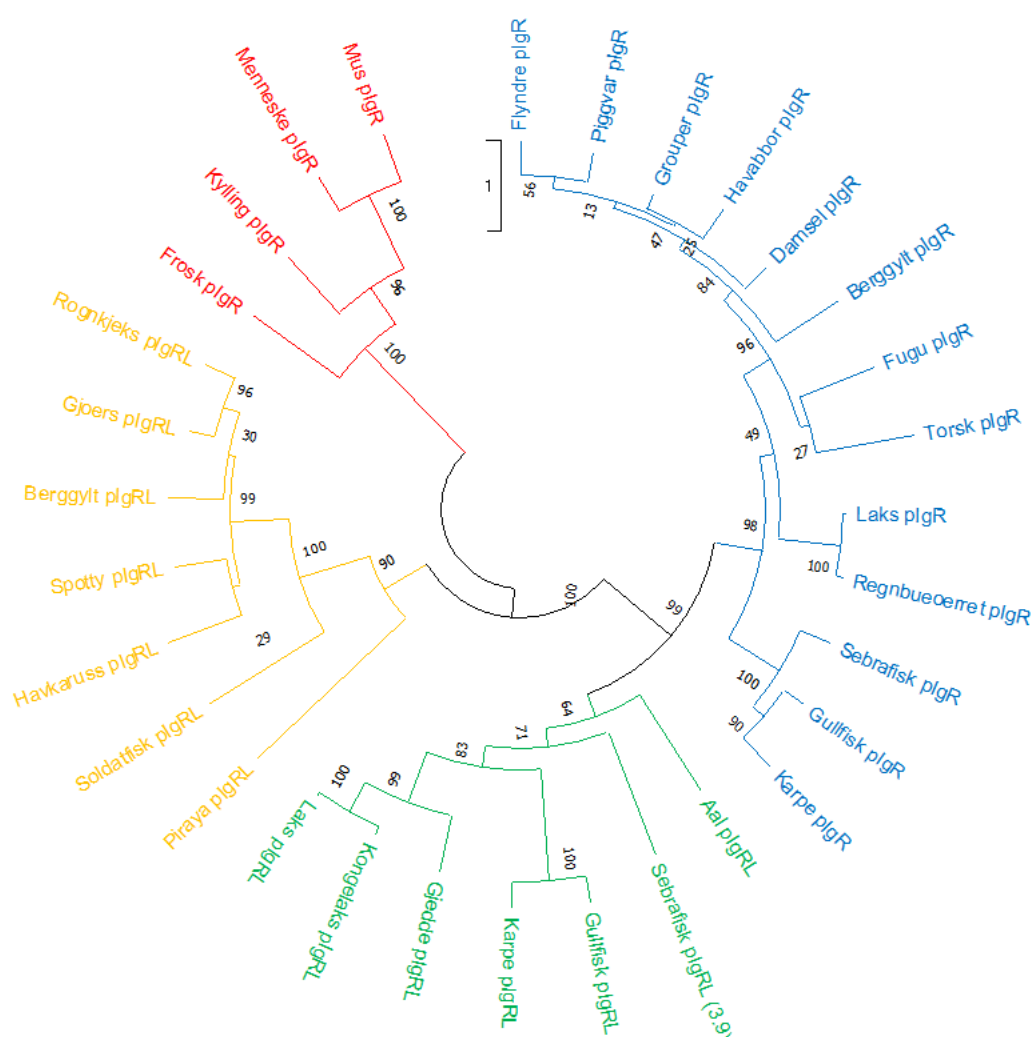
Da denne masteroppgaven ble påbegynt var berggylt pIgR identifisert og delvis karakterisert. Dette genet tilsvarte genet som er publisert fra en rekke andre teleoster, men uttrykkingsmønsteret var ikke helt som forventet dersom det skulle være en funksjonell homolog til pIgR i høyerestående dyr. Søk i berggyltgenomet ledet så mot berggylt pIgRL, som viste høyere score i BLAST-søk, og dette genet ble temaet for denne hovedfagsoppgaven. Genet ble klonet, genomisk organisasjon kartlagt og uttrykkingsmønsteret analysert i en serie med vev ved hjelp av RT-qPCR, samtidig som det fylogenetiske slektskapet med andre pIgR- og pIgRL-gener ble undersøkt. Et interessant trekk ved berggylt pIgRL var at det hadde tre ILD i motsetning til to i pIgR hos teleoster. Hos pattedyr består pIgR av fem ILD, mens det hos fugler, reptiler og amfibier består av fire ILD. Alternativ spleising av genet har blitt beskrevet i kanin og ku, der ILD2 og ILD3 er fraværende (Hamuro et al., 2007). Kylling pIgR har fire ILD som korresponderer med ILD1 og ILD3-5 i pattedyr (Wieland et al., 2004). Selv om strukturlikheten til pIgR i pattedyr, fugler og frosk var interessant indikerte imidlertid uttrykkingsmønsteret til berggylt pIgRL at dette molekylet ikke er en funksjonell homolog til pIgR i høyerestående dyr.

Polypeptidet som kodes av pIgR-genet i teleoster består av to ILD (som korresponderer med ILD1 og ILD5 i pattedyr), en hengselregion, et transmembran-peptid og en cytoplasmatisk hale (Hamuro et al., 2007). Liknende molekyler, kalt for pIgRL, har også blitt identifisert i en rekke teloster: atlantisk laks (*Salmo salar* HM452379), sebrafisk (*Danio rerio* XM_021466400), karpe (*Cyprinus carpio*, XM_019071756) og japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*, HM536144). Strukturen til pIgRL hos disse artene ligner på strukturen til pIgR, med to ILD (Kortum et al., 2014; Liu et al., 2018; Rombout et al., 2008; Tadiso et al., 2011). I motsetning til pIgR uttrykkes pIgRL i lymfocytter hos sebrafisk (Kortum et al., 2014).

Den translaterste berggylt pIgRL-sekvensen viste relativ lav likhet med publiserte pIgRL-sekvenser fra andre teleoster: 28 % med atlantisk laks (*Salmo salar*, HM452379), 21,8 % med sebrafisk (*Danio rerio*, XM_021466400) og litt høyere likhet (38%) med japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*, HM536144). For å identifisere sekvenser som lignet berggylt pIgRL ble det gjort BLAST-søk (i samarbeid med veileder Ivar Hordvik), og det ble funnet tilsvarende molekyler med 3 ILD fra rognkjeks (*Cyclopetrus lumpus*, XM_034544241), gjørs (*Sander lucioperca*, XM_031289048), spotty (*Notolabrus celidotus*, XM_034688120) og havkaruss (*Sparus aurata*, XM_030437348 (alle disse er automatisk predikerte mRNA-sekvenser som ikke er publisert i artikkelform). Aminosyre-alignmentet viste 62.5 % likhet med spotty (*Notolabrus celidotus*, XM_034688120), 58.9% med havkaruss (*Sparus aurata*,

XM_030437348), 55.7 % med rognkjeks (*Cyclopetrus lumpus*, XM_034544241) og 48% likhet med gjørs (*Sander lucioperca*, XM_031289048). pIgRL i berggyllt viste kun 21 % likhet med berggyllt pIgR (XM_020653428). Et fylogenetisk tre ble konstruert for å vise slektskapet mellom pIgR, berggyllt pIgRL og andre pIgRL-sekvenser, Figur (5.1). Navn og Accession nummer over arter som er representert i det fylogenetiske treet er oppsummert i tabell (5.1)

Figur (5.1)



Figur 5.1. Fylogenetisk tre som illustrerer slektskapet mellom berggyllt pIgRL og andre pIgR- og pIgRL-sekvenser. Den blå grenen viser pIgR i ulike teleoster, som består av to ILD. Den grønne grenen viser pIgRL som består av to ILD i ulike teleoster. Gren i gult viser sekvenser som er nærmest beslektet med berggyllt pIgRL. Den røde grenen viser pIgR fra menneske, mus, kylling og frosk.

Tabell 5.1 Oversikt over pIgR- og pIgRL-sekvenser i det fylogenetiske treet i Figur 5.1

Norsk navn/ gen	Engelsk	Latin	Accession no
Berggylt pIgRL	Ballan wrasse	<i>Labrus bergylta</i>	XM_020654174
Karpe pIgRL	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	XM_019071756
Laks pIgRL	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	HM452379
Sebrafisk pIgRL (3.9)	Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	XM_021466400
Kongelaks pIgRL	Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XM_024417571
Gjedde pIgRL	Northern pike	<i>Esox lucius</i>	XM_013134949
Gullfisk pIgRL	Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	XM_026289591
Ål pIgRL	European eel	<i>Anguilla anguilla</i>	XM_035413180
Kylling pIgR	Chicken	<i>Gallus gallus</i>	NM_001044644
Menneske pIgR	Human	<i>Homo sapiens</i>	NM_002644
Mus pIgR	House mouse	<i>Mus musculus</i>	NM_011082
Frosk pIgR	Tropical clawed frog	<i>Xenopus tropicalis</i>	XM_031896818
Rognkjeks pIgRL	Lumpfish	<i>Cyclopterus lumpus</i>	XM_034544241
Gjørs pIgRL	Pike-perch	<i>Sander lucioperca</i>	XM_031289048
Piraya pIgRL	Red-bellied piranha	<i>Pygocentrus nattereri</i>	XM_037543149
Havkaruss pIgRL	Gilthead seabream	<i>Sparus aurata</i>	XM_030437348
Soldatfisk pIgRL	Pinecone soldierfish	<i>Myripristis murdjan</i>	XM_030056215
Spotty pIgRL	New Zealand spotty	<i>Notolabrus celidotus</i>	XM_034688120
Gullfisk pIgR	Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	KY652915
Karpe pIgR	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	GU338410
Sebrafisk pIgR	Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	NM_001302250
Grouper pIgR	Orange-spotted grouper	<i>Epinephelus coioides</i>	FJ803367
Torsk pIgR	Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	KJ460333
Havabbor pIgR	Japanese sea bass	<i>Lateolabrax japonicus</i>	KU516384
Regnbueørret pIgR	Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FJ940682
Flyndre pIgR	Japanese flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	HM536144
Laks pIgR	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	GQ892057
Fugu pIgR	Japanese pufferfish	<i>Fugu rubripes</i>	NM_001280015
Piggvar pIgR	Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	KC142170
Damsel pIgR	Damselfish	<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	XM_022205111
Berggylt pIgR	ballan wrasse	<i>Labrus bergylta</i>	XM_020653428

Berggyllt pIgRL ble karakterisert ved å klonere cDNA fra henholdsvis lever, baktarm og gjelle. Kloning av nyre pIgRL cDNA feilet, sannsynligvis på grunn av tekniske problemer i cDNA-syntesen. I samråd med veileder ble det besluttet å ikke gjøre et nytt forsøk på dette siden kloningen fra de andre vevene resulterte i deteksjon av en rekke ulike mRNA-varianter av genet.

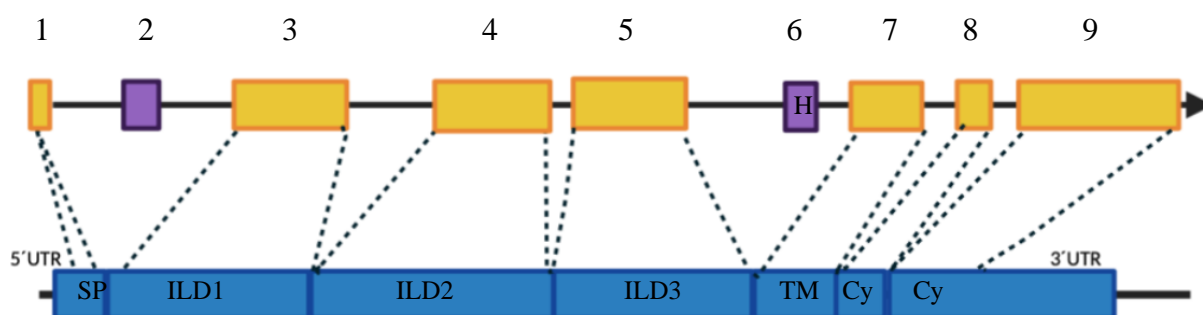
Sekvensanalyse ble utført ved å sammenstille cDNA-sekvensene med den predikerte pIgRL mRNA-sekvensen (XM_020654174) og genomsekvensen fra Scaffold 539 i berggyllt-genomet. Det ble bekreftet at den predikerte spleisvarianten (XM_020654174) var til stede i tarmprøvene som ble analysert. Strukturanalyse av den predikerte varianten viste at primærtranskriptet bestod av 1679 bp, der 45 bp var 5'utranslatert region, 1323 bp åpen leseramme og 311 bp 3'utranslatert region. Den translaterte sekvensen kodet for 441 aminosyrer med en molekylmasse på 49,34 kDa..

Ekson/intron-analyse av pIgRL-genet (i forhold til den predikerte mRNA-sekvensen XM_020654174) i berggyllt viste syv eksoner og seks introner. Første eksonet kodet for signalpeptidet (SP), det andre eksonet kodet for ILD1, det tredje eksonet kodet for ILD2, det fjerde eksonet kodet for ILD3, det femte eksonet kodet for transmembranpeptidet (TM) og noe flankerende sekvens, det sjette eksonet kodet for begynnelsen på cytoplasmisk region (Cy) og det syvende eksonet tilsvarte resten av cytoplasmisk hale, pluss 3' utranslatert region. Hvert ILD viste seg å bli kodet av separate eksoner, i samsvar med publiserte resultater av pIgRL i atlantisk laks (Tadiso et al., 2011) og sebrafisk (Kortum et al., 2014). Dette er et av de karakteristiske trekkene som skiller pIgRL fra pIgR hos teleoster, der det andre ILD-kodende eksonet er splittet i to i pIgR-genet (Kortum et al., 2014; Tadiso et al., 2011).

I tillegg til det predikerte pIgRL-transkriptet (XM_020654174) ble to andre spleisvarianter identifisert, og det ble også klonet to ulike pre-transkripter. Ekson/intron-analyse av spleisvariantene viste at det var to ekstra eksoner i pIgRL-genet. Blant de sekvenserte klonene var det en dominerende variant, representert ved L_k1, L_k5, T_k1, T_k4 og G_k1 (dvs en spleisvariant som var uttrykt i både lever og tarm). Denne varianten hadde et ekstra ekson som kodet for en del av hengselregionen. Den siste spleisvarianten hadde i tillegg et ekstra ekson (ekson 2) spleiset inn mellom eksonene som koder for SP og ILD1. I samråd med veileder ble det bestemt å ikke gå inn på en nærmere analyse av denne varianten. En oversikt over ekson/intron-strukturen til pIgRL-genet er illustrert i Figur (5.2)

Analyse av de translatiserte pIgR-polypeptidene viste at potensielle O-glykosyleringssteder med verdier som oversteg 0,5 befant seg i hengselregionen på den dominerende spleisvarianten. Dette tyder på at denne varianten av proteinet danner en utstrakt «stilk-liknende» struktur som tidligere beskrevet i pIgR- og CD8-molekyler i atlantisk laks (Moore et al., 2005; Tadiso et al., 2011). De forskjellige lengdene på hengselregionen til den predikerte pIgRL-varianten (XM_020654174) og de andre spleisvariantene kan tyde på at de har alternative funksjoner.

Figur (5.2)



Figur 5.2 Skjematisk illustrasjon av ekson/intron-strukturen til pIgRL-genet i berggylt. Eksoner som er markert i gult viser eksoner som er med i den predikerte pIgRL mRNA-sekvensen (XM_020654174). Hvert ILD kodes av separate eksoner. Eksoner markert i lilla viser to ekstra eksoner som var til stede i spleisvariantene som ble detektert i dette masterprosjektet. Ekson nr. 2 og nr. 6 er til stede i klon T_k3, Ekson nr 6 er til stede i klonene L_k1, L_k5, T_k1, T_k4 og G_k1.

Uttrykkingsmønsteret til pIgRL ble undersøkt i en serie av vev, med utgangspunkt i 3 individer. Det ble observert relativt stor individuell variasjon, men trenden i ekspresjonsmønsteret var tydelig. Det høye uttrykkingsnivået av pIgRL i primære lymfoide vev som hodenyre og milt, samt gjelle var ikke helt uventet basert på tidligere publikasjoner av pIgRL-gener i teleoster (Tadiso et al., 2011).

For å oppnå gode resultater fra RT-qPCR undersøkelser er det viktig å ha cDNA av god kvalitet. Dette avhenger i stor grad av godt bevart RNA. Organpakker som ble brukt i RT-qPCR analysen ble dissekert uten kontaminasjon fra andre vev. Vevene ble dissekert umiddelbart etter avliving og overført til RNeasy[®]. cDNA som ble valgt for videre qPCR amplifisering ble syntetisert fra RNA med god kvalitet, og det ble brukt like mengder total-RNA fra hvert vev. Formålet var å estimere relativ mengde pIgRL mRNA i forskjellige vev i

berggylt. Det ble brukt gen-spesifikke primere og SYBR[®] Green reagenser for å amplifisere pIgRL. Referanse-genene ELOV1, UiB3 og RPL viste stor forskjell mellom vevene og ble derfor ikke tatt med i uttrykingsanalysen. Resultatene ble analysert ved å ta utgangspunkt i samme RNA-mengde og ved å bruke relativ sammenligning mot minste registrerte genuttrykk. Selv om det beste ville være å finne et ideelt referanse-gen ble trenden i pIgRL-uttrykingsmønsteret tydelig. Resultatene fra RT-qPCR viste høyt pIgRL-uttrykingsnivå i hodenyre og milt, og lavt uttrykingsnivå i tarm og hud som vist i Figur (4.15). Dette kan tyde på at pIgRL mRNA i berggylten stammer fra leukocytter. Dette samsvarer også med studier utført på pIgRL hos atlantisk laks (*Salmo salar*) (Tadiso et al., 2011). Gjeller skilte seg ut blant de undersøkte vevene, med høyest mengde pIgRL mRNA, noe som kan tyde på at pIgRL har en spesiell rolle i mukosal immunitet (Tadiso et al., 2011). Forsøk i japansk flyndre viste pIgRL-uttrykking i mukosale vev: gjeller, hud og tarm etter eksponering til *V. anguillarum* (Liu et al., 2018). Hos berggylt var imidlertid uttrykkingen av pIgRL relativt lav i baktarm, men individene som ble undersøkt her var ikke eksponert for patogener. Studier i atlantisk laks viste at pIgRL mRNA-nivået økte når fiskene ble eksponert for lakselus (Tadiso et al., 2011). I likhet med laks økte pIgRL-nivået i sebrafisk etter eksponering for *Streptococcus iniae*, der den største økningen ble observert i tarm, noe som tydet på at pIgRL var involvert i mukosal immunitet (Kortum et al., 2014).

På bakgrunn av ekspresjonsmønsteret ble konklusjonen av denne masteroppgaven at det er lite sannsynlig at pIgRL i berggylt er en funksjonell homolog til pIgR. Resultatene indikerer at pIgRL-genet koder for en overflatereseptor på en populasjon av hvite blod-celler.

Referanseliste (6)

- Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2015). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*, 31(2), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Abolofia, J., Asche, F., & Wilen, J. E. (2017). The Cost of Lice: Quantifying the Impacts of Parasitic Sea Lice on Farmed Salmon. *Marine Resource Economics*, 32(3), 329–349. <https://doi.org/10.1086/691981>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. (2002). B Cells and Antibodies, *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884>
- Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0620-0>
- Bilal, S., Lie, K. K., Sæle, Ø., & Hordvik, I. (2018). T Cell Receptor Alpha Chain Genes in the Teleost Ballan Wrasse (*Labrus bergylta*) Are Subjected to Somatic Hypermutation. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01101>
- Bilal, S., Lie, K. K., Dalum, A. S., Karlsen, O. A., & Hordvik, I. (2019). Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene expression in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) revealed an extraordinarily high IgM expression in the gut. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 650–658. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.007>
- Bjorðal, A. (1988). Cleaning symbiosis between wrasses (Labridae) and lice infested salmon (*Salmo salar*) in mariculture. *ICES CM Documents*, F:17. <http://hdl.handle.net/11250/104474>
- Bjorðal, Å. 1991. Wrasse as cleaner-fish for farmed salmon. *Progress in Underwater Science*, 16, 17-28. <http://hdl.handle.net/11250/109019>
- Bowden, T. J., Cook, P. & Rombout J. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 413–427. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.02.003>
- Bilal, S., Lie, K. K., Karlsen, O. A., & Hordvik, I. (2016). Characterization of IgM in Norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses). *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.063>
- Bilal, S., Lie, K. K., Sæle, Ø., & Hordvik, I. (2018). T Cell Receptor Alpha Chain Genes in the Teleost Ballan Wrasse (*Labrus bergylta*) Are Subjected to Somatic Hypermutation. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01101>
- Branson, E.J., Rønsberg, S.S. and Ritchie, G. (2000), Efficacy of teflubenzuron (Calicide®) for the treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1838), infestations of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 31: 861-867. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00509.x>

- Brooker, A. J., Papadopoulou, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183(12), 383–383. <https://doi.org/10.1136/vr.104966>
- Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1–4), 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M. P., Six, A., Benmansour, A., & Boudinot, P. (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(5), 644–654. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.016>
- Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J., & Zou, J. (2011). Expression and Functional Characterization of the RIG-I-Like Receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*, 85(16), 8403–8412. <https://doi.org/10.1128/jvi.00445-10>
- Chen, W., Jia, Z., Zhang, T., Zhang, N., Lin, C., Gao, F., Wang, L., Li, X., Jiang, Y., Li, X., Gao, G. F., & Xia, C. (2010). MHC Class I Presentation and Regulation by IFN in Bony Fish Determined by Molecular Analysis of the Class I Locus in Grass Carp. *The Journal of Immunology*, 185(4), 2209–2221. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000347>
- Costello M. J. (1993) Review of methods to control sea-lice (Caligidae, Crustacea) infestations on salmon farms. I Boxshall G. A. & Defaye D. *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*, s. 219–252. London, UK: Ellis Horwood.
- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22(10), 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Díaz-Rosales, P., Muñoz-Atienza, E., & Tafalla, C. (2019). Role of teleost B cells in viral immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.039>
- Edholm, E.-S., Bengtén, E., Stafford, J. L., Sahoo, M., Taylor, E. B., Miller, N. W., & Wilson, M. (2010). Identification of Two IgD+ B Cell Populations in Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4082–4094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000631>
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9), 827–839. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00038-6)
- Erkinharju, T., Dalmo, R. A., Hansen, M., & Seternes, T. (2020). Cleaner fish in aquaculture: review on diseases and vaccination. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 189–237. <https://doi.org/10.1111/raq.12470>
- Figueiredo, M., Morato, T., Barreiros, J. P., Afonso, P., & Santos, R. S. (2005). Feeding ecology of the white seabream, *Diplodus sargus*, and the ballan wrasse, *Labrus bergylta*, in the Azores. *Fisheries Research*, 75(1–3), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2005.04.013>

- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2009). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 47–59.
<https://doi.org/10.1038/nrg2703>
- Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 438–453. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0003-9>
- Geven, E. J. W., & Klaren, P. H. M. (2017). The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 73–83.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.025>
- Grimholt, U. (2016). MHC and Evolution in Teleosts. *Biology*, 5(1), 6.
<https://doi.org/10.3390/biology5010006>
- Halvorsen, K. T., Sjørdalen, T. K., Durif, C., Knutsen, H., Olsen, E. M., Skiftesvik, A. B., Rustand, T. E., Bjelland, R. M., & Vøllestad, L. A. (2016). Male-biased sexual size dimorphism in the nest building corkscrew wrasse (*Symphodus melops*): implications for a size regulated fishery. *ICES Journal of Marine Science: Journal Du Conseil*, 73(10), 2586–2594.
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw135>
- Halvorsen, K. T., Sjørdalen, T. K., Vøllestad, L. A., Skiftesvik, A. B., Espeland, S. H., & Olsen, E. M. (2016). Sex- and size-selective harvesting of corkscrew wrasse (*Symphodus melops*)—a cleaner fish used in salmonid aquaculture. *ICES Journal of Marine Science*, 74(3), 660–669.
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw221>
- Hamuro, K., Suetake, H., Saha, N. R., Kikuchi, K., & Suzuki, Y. (2007). A Teleost Polymeric Ig Receptor Exhibiting Two Ig-Like Domains Transports Tetrameric IgM into the Skin. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5682–5689. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5682>
- Hamre, L. A., Eichner, C., Caipang, C. M. A., Dalvin, S. T., Bron, J. E., Nilsen, F., Boxshall, G., & Skern-Mauritzen, R. (2013). The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLoS ONE*, 8(9), e73539.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073539>
- Hikima, J., Jung, T.-S., & Aoki, T. (2011). Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(9), 924–936.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.10.011>
- Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 11(1), 137–154.
<https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Hordvik, I. (2015). Immunoglobulin Isotypes in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Biomolecules*, 5(1), 166–177. <https://doi.org/10.3390/biom5010166>
- Hordvik, I., & Mortensen, S. (2019). Berggylt - en mageløs fisk med spesielt immunsystem. *Naturen*, 143(05), 231–236. <https://doi.org/10.18261/issn.1504-3118-2019-05-08>

- Imslund, A. K., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T. A., Nytrø, A. V., Foss, A., Vikingstad, E., & Elvegård, T. A. (2015). Feeding preferences of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) maintained in open net-pens with Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 436, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.048>
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. (2001). B-cell activation by armed helper T cells. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27142/>
- Johnson, S. C., Treasurer, J. W., Bravo, S., Nagasawa, K. & Kabata, Z. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies*, 43 (2): 229- 243. <http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/43.2/229.html>
- Jones, E. Y., Fugger, L., Strominger, J. L., & Siebold, C. (2006). MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 271–282. <https://doi.org/10.1038/nri1805>
- Kaetzel, C. S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological Reviews*, 206(1), 83–99. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00278.x>
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., Aune, L., Jirillo, E., & Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of anatomy*, 217(6), 728–739. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01305.x>
- Kortum, A. N., Rodriguez-Nunez, I., Yang, J., Shim, J., Runft, D., O'Driscoll, M. L., Haire, R. N., Cannon, J. P., Turner, P. M., Litman, R. T., Kim, C. H., Neely, M. N., Litman, G. W., & Yoder, J. A. (2014). Differential expression and ligand binding indicate alternative functions for zebrafish polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and a family of pIgR-like (PIGRL) proteins. *Immunogenetics*, 66(4), 267–279. <https://doi.org/10.1007/s00251-014-0759-4>
- Kryvi, H. & Poppe, T. (2016). *Fiskeanatomi*, Bergen; Fagbokforlaget.
- Leclercq, E., Grant, B., Davie, A., & Migaud, H. (2014). Gender distribution, sexual size dimorphism and morphometric sexing in ballan wrasse *Labrus bergylta*. *Journal of Fish Biology*, 84(6), 1842–1862. <https://doi.org/10.1111/jfb.12402>
- Lie, K. K., Tørresen, O. K., Solbakken, M. H., Rønnestad, I., Tooming-Klunderud, A., Nederbragt, A. J., Jentoft, S., & Sæle, Ø. (2018). Loss of stomach, loss of appetite? Sequencing of the ballan wrasse (*Labrus bergylta*) genome and intestinal transcriptomic profiling illuminate the evolution of loss of stomach function in fish. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4570-8>
- Liu, S., Du, Y., Sheng, X., Tang, X., Xing, J., & Zhan, W. (2019). Molecular cloning of polymeric immunoglobulin receptor-like (pIgRL) in flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its expression in response to immunization with inactivated *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.039>

- Magnadottir, B. (2010). Immunological Control of Fish Diseases. *Marine Biotechnology*, 12(4), 361–379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bøggwald, J., & Dalmo, R. (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19(5), 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.010>
- Mashoof, S., & Criscitiello, M. (2016). Fish Immunoglobulins. *Biology*, 5(4), 45. <https://doi.org/10.3390/biology5040045>
- Mochida, K., Lou, Y. H., Hara, A., & Yamauchi, K. (1994). Physical biochemical properties of IgM from a teleost fish. *Immunology*, 83(4), 675–680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1415062/>
- Moore, L. J., Somamoto, T., Lie, K. K., Dijkstra, J. M., & Hordvik, I. (2005). Characterisation of salmon and trout CD8 α and CD8 β . *Mol Immunol*, 42(10), 1225–1234. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.11.017>
- Mordue (Luntz), A. J. and Birkett, M. A. (2009). A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Caligidae: Copepoda). *Journal Of Fish Diseases*. 32 (1), pp. 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01004.x>
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2015). A Review of the Immunological Mechanisms Following Mucosal Vaccination of Finfish. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00427>
- Muncaster, S., Norberg, B., & Andersson, E. (2013). Natural sex change in the temperate protogynous Ballan wrasse *Labrus bergylta*. *Journal of Fish Biology*, 82(6), 1858–1870. <https://doi.org/10.1111/jfb.12113>
- Murphy, K. & Weaver, C. (2016). *Janeway's Immunobiology* (Ninth Edition). New York: Garland Science. ISBN: 978-0815345053
- Mutoloki, S, Jørgensen, J. B. & Evensen, Ø. (2014) The Adaptive Immune Response in Fish. I Gudding, R., Lillehaug, A. & Evensen, Ø. *Fish vaccination*. (s. 104–115). Chichester: John Wiley & Sons.
- Nakanishi, T., Toda, H., Shibasaki, Y., & Somamoto, T. (2011). Cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.033>
- Nam, B.-H., Hirono, I., & Aoki, T. (2003). The Four TCR Genes of Teleost Fish: The cDNA and Genomic DNA Analysis of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR α -, β -, γ -, and δ -Chains. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3081–3090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3081>
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., Gismervik, K., & Stien, L. H. (2018). Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1398–1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12299>

- Page, D. M., Wittamer, V., Bertrand, J. Y., Lewis, K. L., Pratt, D. N., Delgado, N., Schale, S. E., McGue, C., Jacobsen, B. H., Doty, A., Pao, Y., Yang, H., Chi, N. C., Magor, B. G., & Traver, D. (2013). An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish. *Blood*, 122(8), e1–e11. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-471029>
- Parenti, P., & Randall, J. E. (2011). Checklist Of The Species Of The Families Labridae And Scaridae: An Update. *Zenodo*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1245804>
- Qviller, L., Helgesen, K. O., & Stige, L. C. (2021). *Lakselus – Lepeophtheirus salmonis*. I Sommerset, I., Jensen, B. B., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. *Fiskehelserapporten 2020*. Veterinærinstituttets rapportseire nr 41a, Veterinærinstituttet, ISSN: 1893-1480
- Ribeiro, C. M. S., Bird, S., Raes, G., Ghassabeh, G. H., Schijns, V. E. J. C., Pontes, M. J. S. L., Savelkoul, H. F. J., & Wiegertjes, G. F. (2011). A Novel Soluble Immune-Type Receptor (SITR) in Teleost Fish: Carp SITR Is Involved in the Nitric Oxide-Mediated Response to a Protozoan Parasite. *PLoS ONE*, 6(1), e15986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015986>
- Rimstad, E., Basic, D., Gulla, S., Hjeltne, B. & Mortensen, S. (2017). *Risk assessment of fish health associated with the use of cleaner fish in Aquaculture. Opinion of the Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment*. VKM report 2017:32, ISBN: 978-82-8259-289-5, Norwegian Scientific Committee for Food and Environment (VKM), Oslo, Norway.
- Rombout, J. H., van der Tuin, S. J., Yang, G., Schopman, N., Mroczek, A., Hermesen, T., & Tavernier-Thiele, J. J. (2008). Expression of the polymeric Immunoglobulin Receptor (plgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 24(5), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.01.016>
- Rønneseth, A., Ghebretsaie, D. B., Wergeland, H. I., & Haugland, G. T. (2015). Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.010>
- Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1346–1365. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009>
- Salinas, I. (2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, 4(3), 525–539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Salinas, I., & Parra, D. (2015). Fish mucosal immunity: intestine. I *Mucosal Health in Aquaculture* (s. 135–170). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417186-2.00006-6>
- Samuelsen, O. B. (2015). Persistence and Stability of Teflubenzuron and Diflubenzuron When Associated to Organic Particles in Marine Sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(2), 224–228. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1707-1>
- Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>

- Skiftesvik, A. B., Mortensen, S., & Bjelland, R. M. (2016). *Bruk av rensefisk – muligheter og begrensninger*. I Bakketeig, I. E., Hauge, M., Kvamme, C., Sunnset, B. H. & Toft, K. Ø. *Havforskningsrapporten 2016*, Fisken og havet, særnummer 1, Havforskningsinstituttet, Bergen ISSN: 0802 0620
- Skiftesvik, A. B., Blom, G., Agnalt, A.-L., Durif, C. M. F., Browman, H. I., Bjelland, R. M., Harkestad, L. S., Farestveit, E., Paulsen, O. I., Fauske, M., Havelin, T., Johnsen, K., & Mortensen, S. (2013). Wrasse (Labridae) as cleaner fish in salmonid aquaculture – The Hardangerfjord as a case study. *Marine Biology Research*, 10(3), 289–300.
<https://doi.org/10.1080/17451000.2013.810760>
- Skiftesvik, A. B., Durif, C. M. F., Bjelland, R. M., & Browman, H. I. (2014). Distribution and habitat preferences of five species of wrasse (Family Labridae) in a Norwegian fjord. *ICES Journal of Marine Science*, 72(3), 890–899. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu211>
- Somamoto, T., Koppang, E. O., & Fischer, U. (2014). Antiviral functions of CD8+ cytotoxic T cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 197–204.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.014>
- Star, B., & Jentoft, S. (2012). Why does the immune system of Atlantic cod lack MHC II? *BioEssays*, 34(8), 648–651. <https://doi.org/10.1002/bies.201200005>
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology*, 14(4), 320–326. <https://doi.org/10.1038/ni.2549>
- Tadiso, T. M., Sharma, A., & Hordvik, I. (2011). Analysis of polymeric immunoglobulin receptor- and CD300-like molecules from Atlantic salmon. *Molecular Immunology*, 49(3), 462–473.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.09.013>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O. T., Nilsen, F., Horsberg, T. E., & Jackson, D. (2013). Salmon lice - impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 36(3), 171–194. <https://doi.org/10.1111/jfd.12061>
- Treasurer, J. (2018). *Cleaner Fish Biology and Aquaculture Applications*. Sheffield, UK: 5m Publishing.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinárni Medicina*, 56(No. 10), 486–503.
<https://doi.org/10.17221/3294-vetmed>
- Villegas-Ríos, D., Alonso-Fernández, A., Fabeiro, M., Bañón, R., & Saborido-Rey, F. (2013). Demographic Variation between Colour Patterns in a Temperate Protogynous Hermaphrodite, the Ballan Wrasse *Labrus bergylta*. *PLoS ONE*, 8(8), e71591.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071591>
- Wang, T., & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1703–1718. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.030>

- Wieland, W. H., Orzaez, D., Lammers, A., Parmentier, H. K., Verstegen, M. W., & Schots, A. (2004). A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochemical Journal*, 380(3), 669–676. <https://doi.org/10.1042/bj20040200>
- Wilson, A. B. (2017). MHC and adaptive immunity in teleost fishes. *Immunogenetics*, 69(8–9), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1009-3>
- Xu, Z., Takizawa, F., Parra, D., Gómez, D., von Gersdorff Jørgensen, L., LaPatra, S. E., & Sunyer, J. O. (2016). Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10728>
- Ye, J., Kaattari, I. M., Ma, C., & Kaattari, S. (2013). The teleost humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1719–1728. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015>
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., & Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11(9), 827–835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B Cell Heterogeneity in the Teleost Kidney: Evidence for a Maturation Gradient from Anterior to Posterior Kidney. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6608–6616. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6608>

Appendiks

Molekylvektmarkører

a) «2- Log DNA ladder»

b) «Smart ladder»

